

Dosisfindungsstudie zur Therapie des feline Fibrosarkoms mit
Doxorubicin-beladenen thermosensitiven
Phosphatidylglycerin-Liposomen
mit simultaner regionaler Hyperthermie
Toxizität und Effektivität

von Eva Karin Elisabeth Troedson

Inaugural-Dissertation zur Erlangen der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Dosisfindungsstudie zur Therapie des feline Fibrosarkoms mit
Doxorubicin-beladenen thermosensitiven
Phosphatidylglycerin-Liposomen
mit simultaner regionaler Hyperthermie
Toxizität und Effektivität

von Eva Karin Elisabeth Troedson

aus Karlstad

München 2015

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter Leitung von: Prof. Dr. Johannes Hirschberger

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Johannes Hirschberger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

Morfar

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	5
1.	Das feline Fibrosarkom.....	5
2.	Liposomen	8
2.1.	Geschichte und Entwicklung.....	8
2.2.	Medikamentenfreisetzung	10
3.	Hyperthermie.....	11
3.1.	Entwicklung und Durchführung.....	11
3.2.	Wirkung auf Zellniveau	13
3.3.	Kombinationstherapie	14
3.3.1.	Hyperthermie und Chemotherapeutika	14
3.3.2.	Hyperthermie und thermosensitive Liposomen	15
3.4.	Humanmedizinischer Einsatz der Hyperthermie.....	16
3.5.	Veterinärmedizinischer Einsatz der Hyperthermie	17
4.	Toxizität.....	18
4.1.	Hyperthermie.....	18
4.2.	Liposomen.....	19
4.2.1.	Systemische Toxizität	19
4.2.2.	Lokale Toxizität	20
4.3.	Doxorubicin.....	20
5.	Pharmakokinetik	21
6.	Dosisfindungsstudie.....	22
6.1.	Definition	22

6.2.	Zielpunkte der Studie	23
III.	MATERIAL UND METHODEN	24
1.	Patientenauswahl.....	24
1.1.	Selektion der Patienten.....	24
1.2.	Aufnahme- und Ausschlusskriterien	24
2.	Eingangsuntersuchungen	25
3.	Dosiseskalation	25
4.	Therapieprotokoll.....	26
4.1.	Kontrolluntersuchungen während der Therapie	26
4.2.	Untersuchungen nach Abschluss der Therapie	27
5.	Durchführung der regionalen Hyperthermie	27
5.1.	Aufwärmphase	29
6.	Liposomen: Herstellung und Charakterisierung	30
7.	Anästhesie	31
7.1.	Infusion.....	31
7.2.	Narkoseprämedikation und -einleitung	31
7.3.	Narkosemonitoring.....	32
8.	Probenentnahme.....	32
8.1.	Blutplasma.....	32
8.2.	Tumorbiopsie	33
9.	Pharmakokinetik	33
9.1.	Bestimmung der DOX-Konzentration in Plasma- und Gewebeproben	33
9.2.	Berechnung der pharmakokinetischen Parameter	33
10.	Evaluierung der Toxizität.....	34

11.	Tumoransprechen	34
12.	Weitere Behandlungen nach der Therapiestudie	35
13.	Follow up	35
IV.	ERGEBNISSE	37
1.	Patientendaten	37
2.	Durchgeführte Therapie	38
3.	Tumoransprechen	39
3.1.	Dosisgruppe I	39
3.2.	Dosisgruppe II	40
3.3.	Dosisgruppe III	42
4.	Hyperthermiebehandlung	42
5.	Pharmakokinetik	43
5.1.	Plasma	43
5.2.	Intratumorale DOX-Konzentration	47
6.	Toxizität	47
6.1.	Systemische Toxizität	47
6.1.1.	Dosisgruppe I	47
6.1.2.	Dosisgruppe II	48
6.1.3.	Dosisgruppe III	48
6.2.	Lokale Toxizität	49
6.2.1.	Dosisgruppe I	49
6.2.2.	Dosisgruppe II	49
6.2.3.	Dosisgruppe III	50
7.	Re-Staging	50

7.1.	Dosisgruppe I	50
7.2.	Dosisgruppe II	50
7.3.	Dosisgruppe III.....	51
8.	Weitere Behandlungen nach Abschluss der Therapie	51
8.1.	Dosisgruppe I	51
8.2.	Dosisgruppe II	51
8.3.	Dosisgruppe III.....	52
9.	Follow Up	52
9.1.	Dosisgruppe I	52
9.2.	Dosisgruppe II	53
9.3.	Dosisgruppe III.....	53
V.	DISKUSSION	54
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	68
VII.	SUMMARY.....	71
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	74
IX.	ANHANG	87
1.	Eigenschaften der Studienpatienten	87
2.	Therapieprotokoll.....	88
2.1.	Therapieprotokoll Dosisgruppe I und II.....	88
2.2.	Therapieprotokoll Dosisgruppe III; sowie Patient # V, Dosisgruppe II	89
3.	Tumoransprechen der Patienten	91
4.	Charakterisierung der eingesetzten DPPG₂-TSL-DOX-Chargen	92
5.	Hyperthermie-Daten	93
5.1.	Zusammenfassung	93

5.2.	Hyperthermiedaten der Therapiegruppen.....	94
6.	Systemische Toxizität	95
6.1.	Erythrozyten	95
6.1.1.	Hämoglobin	95
6.1.2.	Hämatokrit.....	98
6.2.	Leukozyten	101
6.2.1.	Gesamtleukozyten	101
6.2.2.	Neutrophile Granulozyten	104
6.3.	Thrombozyten	107
6.4.	Kreatinin.....	110
6.5.	Körpergewicht.....	113
X.	DANKSAGUNG	116

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AUC	Area under the curve	T ₅₀	median gemessene intratumorale Temperatur während der Therapie
CARPA	C activation-related pseudoallergy	T ₉₀	Die Temperatur welche von 90% der aufgezeichneten Temperaturmessungen mindestens erreicht oder überschritten wurde
CEM ₄₃	Äquivalente Anzahl Minuten bei einer Temperatur von 43°C	T _m	Phasenumwandlungstemperatur
CNE	Chronische Nierenerkrankung	TSL	Thermosensitive Liposome
DOX	Doxorubicin	US	Untersuchung
DPPG ₂	1,2-dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphodiglycerol		
EPR-Effekt	Enhanced permeability and retention effect		
FISS	Felines Injektions-assoziiertes Fibrosarkom		
HCM	Hyperthrophie Kardiomyopathie		
HSP	Hitzeschockprotein		
LTSL	Low-thermosensitive Liposome		
MRT	Magnetresonanztomographie		
MTD	Maximum tolerated dose		
PEGylierung	Bindung von Methoxypolyethylenglykol		
PET-MRT	Positronen-Emissions-Tomographie-Magnetresonanztomographie		
QMHT	Quality management in hyperthermia		
RECIST	Response evaluation criteria in solid tumors		
RES	Retikuloendotheliales System		
RHT	Regionale Hyperthermie		

I. EINLEITUNG

Das feline Fibrosarkom ist ein häufig vorkommender Tumor in der Kleintierpraxis. Es ist charakterisiert durch ein invasives Wachstum mit Ausläufern in das umgebende Gewebe, zudem ist das Wachstum schnell und unberechenbar. Diese Tumoren stellen eine Herausforderung für Tierärzte dar. Die Basis der Therapie besteht in einer großräumigen chirurgischen Resektion mit drei bis fünf Zentimetern Rand zum palpierbaren Tumor. Außerdem sollte in die Tiefe mindestens eine Faszien-schicht entfernt werden (MARTANO et al., 2011; PHELPS et al., 2011; LADLOW, 2013). Anhand der Palpation wird das Tumorausmaß häufig unterschätzt, da die Ausläufer in der Tiefe nicht zugänglich sind. Mittels einer CT oder MRT kann das gesamte Tumorausmaß detektiert werden (LADLOW, 2013). Eine alleinige Resektion, auch im umfangreichen Ausmaß, führt dennoch häufig zu Rezidiven. Die Rezidivrate ist vom Umfang der Operation und damit auch von der chirurgischen Erfahrung des Tierarztes abhängig und Rezidivraten von 45 bis zu 70 % wurden dokumentiert (DAVIDSON et al., 1997; CRONIN et al., 1998). Eine adjuvante strahlentherapeutische Behandlung kann die rezidivfreie Zeit verlängern (KOBAYASHI et al., 2002).

Um ein verbessertes Tumoraussprechen bei einem kleinen Primärtumor zu erreichen, wird eine großräumige chirurgische Exzision in Kombination mit einer strahlentherapeutischen Behandlung und einer Chemotherapie empfohlen (MARTANO et al., 2011). Nicht selten werden Katzen aber erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien vorgestellt. Für diese Katzen gibt es wenige therapeutische Möglichkeiten und die Chance auf eine Heilung ist sehr gering. Eine alleinige chemotherapeutische Behandlung bringt keinen langfristigen Erfolg. Am häufigsten wird Doxorubicin (DOX) zur adjuvanten Therapie nach einer Tumorexzision eingesetzt, welches keine spezifische Tumoraaffinität aufweist. Die limitierenden Nebenwirkungen, wie Inappetenz und Myelosuppression, werden durch die systemische Wirkung des DOX im Körper verursacht. Zudem kann eine Nierenschädigung entstehen, wenn die kumulative Dosis von 180 bis 240 mg/m² erreicht wird (MAULDIN et al., 1988; O'KEEFE et al., 1993; KENT, 2013).

Humane Weichteilsarkome weisen ähnliche biologische Eigenschaften wie das feline Fibrosarkom auf. Auch bei diesen Tumoren gibt es keine optimale Therapie und eine Multimodalitätstherapie wird angestrebt. Das klassische Feld der Behandlungsmethoden der Tumorthapie (operative Exzision, Chemotherapie, Strahlentherapie) wird durch die Hyperthermie um eine weitere Behandlungsmöglichkeit erweitert. In der Tiermedizin hat sich diese Therapieoption noch nicht vollständig durchgesetzt.

Die Erwärmung eines soliden Tumors auf Temperaturen im Bereich von 40 bis 43 °C steigert die vaskuläre Perfusion und die Permeabilität der Gefäßwände. Dadurch werden hypoxische Areale, die aufgrund des chaotischen Gefäßaufbaus des Tumors entstanden sind, besser mit Sauerstoff versorgt. Diese Temperaturen führen nicht direkt zum Zelltod, induzieren aber subletale Schädigungen der Tumorzellen. Durch die Kombinationstherapie mit einem Chemotherapeutikum, wie z.B. DOX, wird die aufgenommene Menge des DOX in den Tumorzellen gesteigert und die Reparatur sublethaler Schäden der Tumorzelle verhindert. Diese Zellschäden führen letztendlich zum Zelluntergang. Dabei können Komplexe aus Hitzeschockproteinen, die durch die Erwärmung induziert worden sind, freigesetzt werden. Daraus resultiert eine Immunantwort gegen die Tumorzellen (SAUTER et al., 2000; MILANI et al., 2002; NOESSNER et al., 2002; ISSELS, 2008). Diese Therapiekombination führt bei humanen Weichteilsarkomen zu signifikant besseren krankheits- und progressionsfreien Überlebenszeiten (ISSELS et al., 2010).

Die systemischen Nebenwirkungen des DOX können durch die Verabreichung von liposomalem DOX verringert werden. PEGylierte nicht thermosensitive Liposomen, wie Caelyx®/Doxil®, sammeln sich vermehrt im Tumorgewebe an. Durch eine unzureichende Freisetzung des DOX stehen aber nur geringe Mengen zur Verfügung, was sich durch eine gleichbleibende Ansprechrage zeigt (POIRIER et al., 2002). Aufgrund der Entwicklung von thermosensitiven liposomalen Formulierungen (TSL) wird ein externes Targeting des Medikaments durch die regionale Hyperthermie ermöglicht. Eine sehr schnelle Freisetzung des Wirkstoffes im erwärmten Gebiet wird durch Permeabilitätsänderungen in der Lipiddoppelmembran ermöglicht (HOSSANN et al., 2012). Diese Permeabilitätsänderung findet bei der sogenannten

Phasenumwandlungstemperatur (T_m) statt. Diese liegt meistens im Temperaturbereich von 39 und 42 °C, welche klinisch mittels der Hyperthermie problemlos erreicht werden können (LEOPOLD et al., 1992; SHERAR et al., 1997; WUST et al., 1998; MILANI et al., 2008; OVERGAARD et al., 2009). Durch eine hohe Freisetzungsrates stehen größere Mengen an bioverfügbarem DOX zur Verfügung (MANZOOR et al., 2012; LI et al., 2013). Bei der physiologischen Körpertemperatur weisen diese Liposomen eine hohe Stabilität auf und der Wirkstoff ist sicher eingeschlossen.

Lindner et al. präsentierten im Jahr 2004 eine neue TSL-Formulierung. Diese Formulierung unterscheidet sich durch das synthetische Phospholipid DPPG₂ (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphodiglycerol), welches in der Membran inkorporiert wird (LINDNER et al., 2004). Vorteile dieser Formulierung gegenüber thermosensitiven PEGylierten Liposomen sind die verlängerte Zirkulationszeit im Blut und die erhöhte Stabilität in Anwesenheit von Serum bei 37 °C (LINDNER et al., 2004; HOSSANN et al., 2007; HOSSANN et al., 2012; LIMMER et al., 2014). Die Effektivität dieser Formulierung gegenüber freiem DOX und thermosensitiven sowie nicht thermosensitiven PEGylierten Formulierungen wurde in einem Rattenmodell bewiesen (SCHMIDT, 2011).

Die Kombinationstherapie aus regionaler Hyperthermie (RHT) und DPPG₂-TSL-DOX wurde bereits von Zimmermann bei Katzen mit spontan entstandenen inoperablen Fibrosarkomen eingesetzt (ZIMMERMANN, 2014). Das Fibrosarkom wurde als Studienmodell gewählt da es viele Ähnlichkeiten zum humanen Weichteilsarkom aufweist. Durch die oberflächliche Lage kann eine regionale Hyperthermie mittels eines Oberflächen-Applikators gut durchgeführt werden, zudem wird freies DOX bereits regelmäßig als Therapiebestandteil verwendet. Das eingesetzte DPPG₂-TSL-DOX, in Dosierungen von 0,1 bis 0,4 mg/kg, wurde gut vertragen und führte zu keinen systemischen Nebenwirkungen. Jedoch konnten milde, subakute Nebenwirkungen der Hyperthermie aufgezeichnet werden. Ein therapeutischer Effekt konnte bereits bei 0,2 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX verzeichnet werden, obwohl diese Dosis lediglich einem Fünftel der Standarddosis von freiem DOX entspricht (ZIMMERMANN, 2014). Anhand dieser vielversprechenden Daten besteht die Hoffnung, dass diese neoadjuvante Therapiemöglichkeit routinemäßig eingesetzt werden kann. Die

maximal tolerierte Dosis wurde noch nicht erreicht. Ziel dieser Studie ist die Dosis des DPPG₂-TSL-DOX weiter zu steigern. Das externe Targeting führt zu einer Freisetzung des DOX in der Zielläsion, was erwiesenermaßen zu einer größeren Wirksamkeit des DOX führt. Dadurch wird erwartet, dass die Tumorzunahme bei fortgeschrittenen Fibrosarkomen mit steigender Dosis verlangsamt wird und eine operative Exzision erleichtert wird. Somit stehen nun für diese Patienten die gleichen therapeutischen Möglichkeiten zur Verfügung, wie für Patienten, die mit einem kleinen operablen Tumor vorstellig werden. Damit wird die Heilungschance verbessert.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das feline Fibrosarkom

Die erste Beschreibung des injektionsassoziierten feline Fibrosarkoms stammt aus dem Jahr 1991 (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991). Aufgrund einer Tollwutepidemie 1987 bei den Waschbären in Pennsylvania wurden die Impfvorschriften für Katzen verschärft und eine subkutane Impfinjektion wurde erlaubt. In den folgenden Jahren wurden deutlich mehr feline Fibrosarkome an den Bereichen histopathologisch diagnostiziert, welche häufiger für eine subkutane Injektion verwendet wurden (HENDRICK et al., 1992).

Schon bei den histopathologischen Untersuchungen der Tumoren im Jahr 1991 fiel ein grau-braunes Material in den Makrophagen auf, welches als Aluminium identifiziert wurde (HENDRICK et al., 1992). Aluminium wurde in diesem Zeitraum häufig als Adjuvans in Tollwutimpfstoffen verwendet (HENDRICK et al., 1992). Es wurde von einer Tumorentstehung aufgrund von verschiedenen Vakzinen und deren Adjuvantien ausgegangen, da auch Katzen mit beispielsweise einer vorherigen Impfung gegen das Feline Leukämievirus Tumoren entwickelten (HENDRICK & GOLDSCHMIDT, 1991; MACY & GUILLERMO COUTO, 2001; MARTANO et al., 2011). Daraus folgte die Benennung „impfassoziiertes Fibrosarkom“. Heute ist diese Bezeichnung veraltet, da jede subkutane oder intramuskuläre Injektion eine Injektions-assoziierte chronische Entzündung hervorrufen kann. Diese Reaktion kann auch Jahre später noch tumorös entarten. Studien haben belegt, dass ein auslösender Agens Depot-Kortison, Depot-Antibiotikum aber auch Implantation eines Mikrochips oder nicht resorbierbares Nahtmaterial sein kann (MCENTEE & PAGE, 2001; SEGUIN, 2002; KASS et al., 2003; DALY et al., 2008; CARMINATO et al., 2011; SRIVASTAV et al., 2012). Daraus entstand die neue Bezeichnung „Felines Injektions-assoziiertes Fibrosarkom“ (FISS).

In der Literatur wird die Inzidenz von FISS mit 1/1 000 – 1/10 000 Katzen (ESPLIN et al., 1993; LESTER et al., 1996) bis 0,63/10 000 Katzen (GOBAR & KASS, 2002) beschrieben. Die Inzidenz für das eher am Kopf oder distalen Gliedmaßen entstehende nicht injektions-assoziierte Fibrosarkom ist nicht

bekannt. Es besteht keine Prädisposition nach Geschlecht oder Rasse. Ein Peak ist im Alter von 6 bis 7 Jahren erkennbar, ein zweiter Peak im Alter von zehn bis elf Jahren (KASS et al., 1993), welches sich durch eine sehr variable und manchmal lange Latenzzeit erklären lässt. Die Latenzzeit kann von drei Monaten bis zu drei bis zehn Jahren variieren (MCENTEE & PAGE, 2001; SEGUIN, 2002).

Das FISS ist ein bösartiger mesenchymaler Tumor der sich lokalinvasiv verhält und durch eine schnelle Wachstumsrate mit einer relativ niedrigen Metastasierungsneigung charakterisiert wird (MARTANO et al., 2011). Metastasierungsraten von 10 bis 20 % sind beschrieben (MACY & GUILLERMO COUTO, 2001). Bei einer Metastasierung ist am häufigsten die Lunge betroffen (LADLOW, 2013). Der Tumor neigt zur Ausbildung von sogenannten Ausläufern, die invasiv entlang Faszien, Muskulatur und Knochen in die Tiefe wachsen. Diese können bei der klinischen Untersuchung schwierig zu entdecken sein, da der Tumor zudem häufig eine Pseudokapsel ausbildet, welche den Eindruck hinterlässt, als wäre der Tumor gut abgrenzbar.

Eine Feinnadelaspiration mit anschließender zytologischer Untersuchung ist in ungefähr 50% der Fälle diagnostisch. Eine histologische Untersuchung von einer Gewebeprobe liefert jedoch höhere Chancen auf eine sichere Diagnose (MARTANO et al., 2011).

Eine optimale Therapie des FISS mit hohen Chancen auf eine Heilung ist nicht bekannt. Therapeutisch wird empfohlen mit verschiedenen Ansätzen in Sinne einer Multimodalitätstherapie vorzugehen (MARTANO et al., 2011). Als Standardempfehlung gilt eine radikale Exstirpation mit drei bis fünf Zentimetern Rand vom palpierbarem Tumor, außerdem sollte in die Tiefe mindestens eine Faszien-schicht entfernt werden. Aus dieser Empfehlung geht hervor, dass in einigen Fällen knöcherne Strukturen wie beispielsweise Rippen, Dornfortsätze o.ä. entfernt werden müssen oder sogar eine Gliedmaßenamputation nötig ist (MARTANO et al., 2011; PHELPS et al., 2011; LADLOW, 2013). Es gibt keinen ausreichenden Hinweis darauf, dass eine bildgebende Untersuchung mit Kontrastmittel vor einer chirurgischen Exzision zu verbesserten Überlebenszeiten führt. Allerdings wird die Planung des chirurgischen Eingriffes dadurch erleichtert, da das FISS eine starke Kontrastmittelanreicherung aufweist und die Ausläufer sich identifizieren lassen (LADLOW, 2013).

Auch nach einer alleinigen radikalen Exzision sind Rezidivraten von 45 bis 70% dokumentiert worden (DAVIDSON et al., 1997; CRONIN et al., 1998). Die krankheitsfreie Zeit kann aber durch eine radikale erste Operation, durchgeführt durch einen erfahrenen Chirurgen, signifikant verlängert werden (HERSHEY et al., 2000). Giudice et al. zeigten, dass inkomplett resezierte Tumoren eine zehnfach höhere Rezidivrate aufweisen in Vergleich zu komplett entfernten Tumoren. Allerdings fand auch bei 19 % der komplett entfernten Tumoren eine Rezidivierung statt (GIUDICE et al., 2010). Davidson et al. konnten in einer Studie zeigen, dass die krankheitsfreie Zeit nach einer alleinigen operativen Exzision median zehn Monate betrug. Katzen mit histologisch sauberen Rändern wiesen eine krankheitsfreie Zeit von sechzehn Monaten auf, in Vergleich zu denen mit einer inkompletten Exzision, die nur vier Monaten krankheitsfrei waren (DAVIDSON et al., 1997).

Eine Strahlentherapie kann als neoadjuvante oder adjuvante Therapie eingesetzt werden. Der Einsatz einer Strahlentherapie vor einer chirurgischen Entfernung dient der Hoffnung einer Verkleinerung des Tumorumfanges sowie einer Schrumpfung der Ausläufer, um die Operation zu erleichtern. Nach einer Exzision dient die Strahlentherapie der Abtötung von mikroskopischen Tumorresten im Tumorbett (LADLOW, 2013). Die krankheitsfreie Zeit konnte durch eine neoadjuvante Strahlentherapie verlängert werden. Bei einer vollständigen chirurgischen Exzision wiesen die Katzen ein signifikant längeres krankheitsfreies Intervall mit 986 Tagen auf, verglichen mit 292 Tagen bei Katzen mit inkomplett exzidierten Tumoren (KOBAYASHI et al., 2002). Mit einer adjuvanten Strahlentherapie konnte eine mediane progressionsfreie Zeit von 1110 Tagen erreicht werden (ECKSTEIN et al., 2009).

Die Wirksamkeit einer Chemotherapie bei FISS ist nicht bestätigt (LADLOW, 2013). DOX und Mitoxantron weisen eine hohe Effektivität bei FISS-Zellkulturen auf (WILLIAMS et al., 2001). Allerdings konnte Martano et al. keinen statistisch signifikanten Unterschied in der krankheitsfreien Zeit feststellen, bei Katzen, die eine DOX-Chemotherapie und radikale Exzision des Tumors bekamen, verglichen mit Katzen die nur eine Operation unterliefen (MARTANO et al., 2005). Poirier et al. zeigte, dass DOX und liposomales DOX (Doxil®) als Kombinationstherapie mit Chirurgie effektiv sind. Beide Medikamente führten zu längerer

krankheitsfreier Zeit, als die alleinige chirurgische Resektion (388 vs. 93 Tage). Im Hinblick auf die Überlebenszeit gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Katzen, die nur eine operative Exzision des Tumors unterliefen, im Vergleich zu den Katzen die zusätzlich DOX oder liposomales DOX erhielten. Allerdings zeigte sich, dass in Liposomen eingeschlossenes DOX mehr Nebenwirkungen in Form von Nephrotoxikosen und anaphylaktoiden Reaktionen aufwies und deshalb bestand kein Vorteil in der Applikation von liposomalem DOX (POIRIER et al., 2002).

Bei inkomplett resezierten Tumoren war mit 15,4 Monaten das krankheitsfreie Intervall nach einer Kombination aus Strahlentherapie und DOX signifikant länger, als nach einer postoperativen Strahlentherapie mit 5,7 Monaten. Allerdings gab es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Überlebenszeit der beide Gruppen (HAHN et al., 2007). Eine Kombination aus liposomalem DOX (Caelyx®) und einer Strahlentherapie ohne eine chirurgische Exzision führte zu einem medianen progressionsfreien Intervall von 117 Tagen. Im Vergleich zu anderen Therapiekombinationen wies dieser Ansatz keine Überlegenheit auf (KLEITER et al., 2010).

2. Liposomen

2.1. Geschichte und Entwicklung

Liposomen sind künstlich hergestellte, rundliche Vesikel, die durch eine Doppelmembran begrenzt werden. Ihre erste Beschreibung stammt aus dem Jahre 1965 von Bangham et al (BANGHAM et al., 1965).

Die Membran umschließt ein wässriges Kompartiment und setzt sich vorwiegend aus Lipiden, wie Phospholipide und Cholesterol, zusammen. Nach Beladung des wässrigen Kompartiments mit hydrophilen Medikamenten können Liposomen als Arzneimittelcarrier benutzt werden. Liposomen, mit beispielsweise eingeschlossenem DOX, können die systemischen Nebenwirkungen des DOX reduzieren und zu einer verbesserten Akkumulation des DOX im Tumor führen (MINCHINTON & TANNOCK, 2006; LANDON et al., 2011).

Die anfänglichen Liposomen führten zu einer verminderten Toxizität des eingeschlossenen Wirkstoffes. Allerdings nahmen die Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES) den intravenös applizierten Wirkstoff rasch auf, was zu einer geringeren Verfügbarkeit des Wirkstoffes führte (FIDLER et al., 1980; POSTE et al., 1982; GULATI et al., 1998). Durch die Einbindung von Methoxypolyethylenglykolen in die Membran, die sogenannte PEGylierung, konnte die Opsonisierung umgangen werden, so wurden längere Zirkulationszeiten ermöglicht (PAPAHADJOPOULOS et al., 1991).

Die ersten thermosensitiven Liposomen (TSL) wurde von Yatin et al. 1978 entwickelt (YATVIN et al., 1978). Nachteil dieser Formulierung war, dass eine Temperatur von 42,5 bis 44,5 °C benötigt wurde, um eine Freisetzung des Inhaltes zu induzieren (YATVIN et al., 1978). Dabei erfolgte die Freisetzung sehr langsam und die Liposomen wurden über das RES schnell aus der Blutbahn entfernt. Die ursprüngliche Zusammensetzung der TSL wurde mehrmals überarbeitet. Needham et al. entwickelte die erste low-thermosensitive liposome (LTSL)-Formulierung, die in einer klinischen Studie am Menschen untersucht wurde. Diese durch Lysolipide destabilisierte Liposomen setzten ihren Inhalt rasch (circa 50% innerhalb von 20 Sekunden bei 42 °C) frei und wiesen durch eine Inhibition des RES längere Zirkulationszeiten im Körper auf (ANYARAMBHATLA & NEEDHAM, 1999; KONG & DEWHIRST, 1999; KONG et al., 2000; NEEDHAM et al., 2000).

Lindner et al. präsentierten in Jahr 2004 eine neue liposomale Formulierung. Der ausschlaggebende Unterschied dieser Formulierung ist das synthetische Phospholipid, DPPG₂ (1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphodiglycerol) welches in der Membran inkorporiert ist. Auf eine PEGylierung wurde verzichtet (LINDNER et al., 2004). DPPG₂-TSL zeigte eine gleich schnelle Freisetzungsrates des DOX bei 42 °C wie PEGylierte LTSL, wies aber längere Zirkulationszeiten auf und die Anwesenheit von Serum bei 37 °C führte über die Zeit zu einer höheren Stabilität der Liposomen. PEGylierte TSL hingegen werden durch Serum destabilisiert (LINDNER et al., 2004; HOSSANN et al., 2007; HOSSANN et al., 2012; LIMMER et al., 2014). Die Vorteile der DPPG₂-TSL konnten in einem Rattenmodell gezeigt werden, dabei zeigten DPPG₂-TSL eine bessere Wirksamkeit als freies DOX und die TSL-analogen Caelyx® und ThermoDox®

(SCHMIDT, 2011).

Momentan sind DPPG₂-TSL die einzige TSL-Formulierung, die alle Kriterien für eine wärmeinduzierte, intravaskuläre Medikamentenfreisetzung erfüllen (KNEIDL et al., 2014).

2.2. Medikamentenfreisetzung

Nach der intravenösen Applikation der LTSL zirkulieren die Liposomen mit dem eingeschlossenen Wirkstoff im Blutstrom. Die Wirkstofffreisetzung geschieht erst bei Temperaturen oberhalb der physiologischen Körpertemperatur, weshalb der Wirkstoff bei normaler Temperatur sicher eingeschlossen ist. Wenn die von außen lokal erwärmte Zielläsion erreicht wird, kommt es aufgrund von Permeabilitätsänderungen in der Doppelmembran zur schnellen Wirkstofffreisetzung aus den LTSL (HOSSANN et al., 2012). Die Phospholipide der Membran befinden sich bei physiologischer Körpertemperatur in einer stabilen Gelphase, deren Charakterisierung sich durch eine geringe Permeabilität für hydrophile Substanzen auszeichnet (HOSSANN et al., 2012). Bei Temperaturen über der für die Membranlipide der LTSL charakteristischen Phasenumwandlungstemperatur (T_M), befinden sich die Phospholipiden in einer flüssigen Phase. In dieser Phase ist die Permeabilität für wasserlösliche Substanzen erhöht und es kommt zur Freisetzung des hydrophilen Wirkstoffes (HOSSANN et al., 2012). Bei den häufig verwendeten LTSL liegt die T_m bei Temperaturen von 39 bis 42 °C, kann aber über Änderungen der Lipidzusammensetzung verändert werden (HOSSANN et al., 2007; LINDNER & HOSSANN, 2010). Die Freisetzung aus den LTSL kann außerdem über eine Modifizierung der LTSL-Größe erreicht werden (HOSSANN et al., 2010).

Die intravaskuläre Freisetzung des Wirkstoffes führt zu einer hohen Wirkstoffkonzentration innerhalb der Blutgefäße des Tumors (MANZOOR et al., 2012; LI et al., 2013). Das DOX wandert entlang des entstandenen Konzentrationsgradienten tief in das Tumorgewebe und ist sofort bioverfügbar. Manzoor et al. konnte in einem Fensterkammermodell an der Maus zeigen, dass DOX aus LTSL signifikant tiefer in den Tumor eindringt als freies DOX. Außerdem konnte anhand von histologischen Tumoranalysen nachgewiesen werden, dass DOX aus LTSL auch tiefer als Doxil® in das Tumorgewebe

eindringt (MANZOOR et al., 2012).

PEGylierte Liposomen zirkulieren über einen längeren Zeitraum im Gefäßsystem des Körpers und passieren mehrfach durch den Tumor (KONING et al., 2010). Es kommt zu einem passiven Targeting des Tumors durch den EPR-Effekt (enhanced permeability and retention effect) (LANDON et al., 2011; MAEDA et al., 2013). Dieser Effekt beruht auf einer erhöhten Durchlässigkeit des Gefäßendothels des Tumors, welches Poren bis zu 800 nm Durchmesser aufweist. Eine Extravasation der Liposomen mit einer Größe von 50 bis 250 nm kann dadurch problemlos stattfinden (LINDNER & ISSELS, 2003; LAGINHA et al., 2005). Durch einen stark beeinträchtigten Lymphgefäßaufbau innerhalb des Tumors bleiben die Liposomen über einen längeren Zeitraum im Tumorinterstitium (MAEDA et al., 2013).

Nur freigesetztes DOX weist eine biologische Aktivität auf. Der therapeutische Effekt des liposomalen DOX korreliert mit dem Niveau des verfügbaren DOX und nicht mit der totalen Menge an DOX im Tumor. Freies DOX kann einerseits in die Tumorzellen diffundieren und im Zellkern an die DNA binden (LAGINHA et al., 2005), andererseits kann auch eine Bindung im Zellkern der Endothelzellen stattfinden (NEEDHAM et al., 2000). Durch ein aktives oder passives Targeting weist liposomales DOX bei der Therapie von einigen soliden Tumoren Vorteile gegenüber freiem DOX auf (LAGINHA et al., 2005).

3. Hyperthermie

3.1. Entwicklung und Durchführung

Bei einer Hyperthermietherapie wird der Körper oder Bereiche des Körpers über die physiologische Körpertemperatur hinaus erwärmt. Die Zieltemperatur beträgt 40 bis 44 °C und muss dementsprechend vom thermoablativen Verfahren unterschieden werden. Beim thermoablativen Verfahren entstehen durch Temperaturen über 60 °C irreversible Koagulationsnekrosen im Tumor. Der potentielle Vorteil einer Tumorbehandlung mittels Hyperthermie wurde schon in den 70er Jahren erkannt. Daraus entwickelten sich verschiedene

Behandlungsmethoden. Mittlerweile wird zwischen einer lokalen, regionalen, interstitiellen, Teilkörper-, sowie einer Ganzkörperhyperthermiebehandlung unterschieden. Die Lage des Tumors entscheidet darüber, welche Methode verwendet wird. Die Teilkörperhyperthermie bietet die meisten Anwendungsmöglichkeiten und wird unter nichtinvasiver MRT-Kontrolle durchgeführt. Hier entsteht die Möglichkeit tiefer gelegene Tumoren zu therapieren (WUST et al., 2003). Die Erwärmung der Zielläsion kann durch Ultraschall, Hochfrequenzultraschall, Mikrowellen oder Laser herbeigeführt werden, dementsprechend gibt es Hyperthermiesysteme mit verschiedenen aufgebauten Applikatoren. Ausschlaggebend für die Therapie ist, dass die Temperatur in der Zielläsion und in dem umliegenden Gewebe aufgezeichnet wird. So kann kontrolliert werden, dass die erwünschte Temperatur in der Zielläsion erreicht wird und keine Hotspots im umliegenden gesunden Gewebe entstehen. Eine Temperatursonde wird in der Zielläsion platziert und eine zweite am umliegenden gesunden Gewebe angebracht. Eine dritte Sonde kontrolliert die systemische Körpertemperatur (BRUGGMOSER et al., 2012). Da Tumoren einen recht heterogenen Aufbau aufweisen, ist eine gleichmäßige Erwärmung im gesamten Tumor schwer zu erreichen (LANDON et al., 2011). Für die Therapieevaluierung wird der experimentelle Wert CEM_{43} (äquivalente Anzahl Minuten bei einer Temperatur von 43 °C) herangezogen. Dieser Wert setzt sich aus den unterschiedlichen Temperaturabschnitten während der Hyperthermie zusammen, dabei beschreibt CEM_{43} den therapeutischen Nutzen für eine angewandte Temperatur (ISSELS, 2008; LINDNER & ISSELS, 2011). Anhand von Temperaturanalysen wurde nachgewiesen, dass Patienten, die nach der Therapie über einen längeren Zeitraum eine lokale Tumorkontrolle aufwiesen, signifikant höhere Temperaturen im Tumor zeigten, als Patienten die nicht auf die Therapie angesprochen hatten (ISSELS et al., 1991; SCHLEMMER et al., 2003).

Die Therapiedauer einer Standardhyperthermie beträgt in der Regel 60 Minuten, plus einer Aufwärmphase von maximal 30 Minuten. Da diese Therapie häufig mehrmals durchgeführt wird, muss auf eine identische Lagerung der Patienten bei jeder Sitzung geachtet werden (BRUGGMOSER et al., 2012).

Zu Beginn der Hyperthermieforschung war das Ziel, einen Zelltod durch relativ hohe Temperaturen zu erreichen. Diese Festlegung wurde lange nicht in Frage

gestellt und die Erkenntnisse über die entscheidenden biologischen Effekte, die durch die Kombination aus Hyperthermie und anderen onkologischen Therapien hervorgerufen werden, blieben unbekannt. Positive biologische Effekte werden mit Temperaturen zwischen normothermen Bedingungen und zytotoxischen Temperaturen, sprich zwischen 39 bis 42 °C, erreicht, wenn diese über einen Zeitraum von einer Stunde appliziert werden. Zu den positiven Effekten zählen die Inhibition der Reparatur von Zellschäden, welche durch die mit dazu angewandte Therapie verursacht worden sind, sowie Veränderungen in der Gefäßperfusion und damit die Reoxygenierung innerhalb des Tumors. Außerdem findet eine Freisetzung von Hitzeschockproteinen statt, welche eine Stimulation des Immunsystems bewirkt (DEWHIRST et al., 2005).

Hyperthermie als Bestandteil der Tumorthherapie wird in Deutschland relativ häufig eingesetzt, in Vergleich zu anderen europäischen Ländern. Dabei befinden sich führende deutsche Forschungseinrichtungen am Klinikum Großhadern in München sowie am Klinikum Charité in Berlin. Neben anderen europäischen Forschungsinstituten ist die Duke Universitätsklinik in Durham, USA, führend (WUST et al., 2003).

3.2. Wirkung auf Zellniveau

Eine maligne Transformation der Zellen findet in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus statt. Zellen reagieren in dieser Phase besonders empfindlich auf eine Erwärmung und die Transformation kann durch eine Hyperthermie reduziert werden (ISSELS, 2008). Eine direkte zytotoxische Wirkung der Hyperthermie wird mit Temperaturen über 43 °C erreicht. Durch die Denaturierung der Zellproteine gehen die Zellen zugrunde (ISSELS, 2008). Temperaturen unter 43 °C sind nicht direkt zytotoxisch, sondern führen zu subletalen Schädigungen. Das bedeutet, dass diese Temperaturen nicht zu DNA-Strangbrüchen führen, sondern zu Veränderungen in der Chromatinstruktur, welche die DNA-Reparatur beeinflussen. Eine Nekrose oder Apoptose, die letztendlich zum Zelluntergang führt, wird erst durch die Kombination von Hyperthermie und Chemo- oder Strahlentherapie hervorgerufen (ISSELS, 2008). Auf molekularer Ebene führt eine Erwärmung zu Instabilität und schließlich zur irreversiblen Zerstörung von Proteinen des Zellkerns, Zytoplasma und Zellmembran. Dadurch folgt eine Hemmung der Reparaturmechanismen der DNA sowie von Proteinen, die für die

Zellzyklusregulation verantwortlich sind (ISSELS, 2008). Die Zelle antwortet darauf mit einer ansteigender Produktion von sogenannten Hitzeschock-Proteinen (HSP) (SAUTER et al., 2000; NOESSNER et al., 2002). Aufgrund der Expression der HSP an der Zellmembran der Tumorzellen werden diese Zellen von natürlichen Killerzellen erkannt (GASTPAR et al., 2005) und das angeborene Immunsystem wird aktiviert (STANGL et al., 2011). Sterben Tumorzellen ab, können Komplexe aus HSP-Peptiden freigesetzt werden. Werden diese den dendritischen Zellen präsentiert, kommt es zu einer adaptiven T-Zell Antwort (SAUTER et al., 2000; NOESSNER et al., 2002). Eine Erwärmung des Tumors hat meist eine positive Auswirkung auf das Immunsystem des Patienten und kann, sowohl das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem aktivieren (MILANI et al., 2002).

3.3. Kombinationstherapie

3.3.1. Hyperthermie und Chemotherapeutika

In Vergleich zum normalen Gewebe ist der Gefäßaufbau innerhalb eines soliden Tumors chaotisch, wodurch hypoxische Areale mit niedrigen pH-Wert entstehen (LINDNER & ISSELS, 2011). Kritische Faktoren für die Medikamentenaufnahme in den Tumor sind der Blutfluss und die vaskuläre Permeabilität, wobei diese Faktoren durch die Hyperthermie gefördert werden (JAIN, 2005; ISSELS, 2008). Eine erhöhte vaskuläre Perfusion und damit gesteigerte Permeabilität wird durch die lokale Tumorerwärmung auf Temperaturen zwischen 40 bis 43 °C erreicht. Hypoxische Areale werden, durch den erhöhten Blutfluss, besser mit Sauerstoff versorgt und Chemotherapeutika können diese Tumorbereiche besser erreichen (LANDON et al., 2011). Daraus geht hervor, dass Tumorzellen in Bereichen mit einer niedrigen Perfusion sowohl sensitiv auf die Hyperthermie reagieren, als auch nahezu selektiv zerstört werden können (VAUPEL et al., 1989). Dieser positive Effekt tritt nicht bei Temperaturen unter 40 °C auf. Bei hohen Temperaturen können Gefäßverschlüsse und Blutungen auftreten, die zu einem reduzierten Blutfluss und damit zu einer schlechteren Versorgung mit dem Chemotherapeutikum führen, deshalb wird die Hyperthermie bei Temperaturen von 40 bis 43 °C durchgeführt (LANDON et al., 2011).

Die Interaktion zwischen DOX und Wärme zeigt einen Schwellenwert bei

ungefähr 42,5 °C (ISSELS, 2008). Durch die Kombination kommt es zur erhöhten Aufnahme des Chemotherapeutikums im Nucleus der Tumorzelle. Die Reparatur von letalen oder subletalen Schäden, die durch das Chemotherapeutikum hervorgerufen worden sind, wird ebenfalls gebremst. Diese Faktoren führen zu einer gesteigerten Wirkung des Chemotherapeutikums. Ein geringerer synergistischer Effekt wird beobachtet wenn die Hyperthermie vor der DOX-Gabe appliziert wird (ISSELS, 2008).

Eine synergistische Hyperthermie fördert die Toxizität des Chemotherapeutikums innerhalb des Tumors, ohne die systemische Toxizität zu verstärken (ISSELS, 2008). In vivo nehmen die nekrotischen Anteile des Tumors durch die kombinierte Therapie zu, wobei das Ausmaß dieser nekrotischen Anteile herangezogen wird, um das Ansprechen auf die Therapie zu beurteilen (LINDNER & ISSELS, 2011).

3.3.2. Hyperthermie und thermosensitive Liposomen

Die Therapiekombination aus Hyperthermie und thermosensitiven Liposomen ermöglicht, durch ein externes Targeting, eine exakte Freisetzung des Wirkstoffes innerhalb der Blutgefäße des Tumors. Es folgt, wie bereits dargelegt, eine erhöhte Extravasation der Liposomen in das Tumorgewebe (LANDON et al., 2011). Dadurch werden die systemischen Nebenwirkungen minimiert, denn die maximale Wirkstoffkonzentration befindet sich lokal im Tumor (MATTEUCCI et al., 2000).

Traditionelle thermosensitive Liposomen brauchen relativ hohe Temperaturen, 42,5 bis 44,5 °C, um ihren Inhalt freizusetzen (YATVIN et al., 1978; YATVIN et al., 1981; GABER et al., 1996). Wenn Tumoren auf diese Temperaturen erhitzt werden, entstehen Schmerzen für den Patienten und die Gefahr einer Schädigung der umliegenden Gewebe ist erhöht (DEWHIRST & SIM, 1984; DEWHIRST et al., 1984; BEN-YOSEF & KAPP, 1992; THRALL et al., 1992).

Die Entwicklung von neuartigen thermosensitiven Liposomen, LTSL, ermöglicht eine Wirkstofffreisetzung schon bei Temperaturen von 39 bis 42 °C. Diese Temperaturen können bei oberflächlichen und auch etwas tiefer gelegenen Tumoren leicht erreicht werden (LEOPOLD et al., 1992; SHERAR et al., 1997; WUST et al., 1998; MILANI et al., 2008; OVERGAARD et al., 2009).

3.4. Humanmedizinischer Einsatz der Hyperthermie

Eine Hyperthermie-Therapie stellt einen Teil in einer Multimodalitätstherapie dar und wird nur mit einer anderen onkologischen Therapie, wie Chemotherapie oder Bestrahlungstherapie, durchgeführt (WUST et al., 2003). Seit Anfang der neunziger Jahren wurden diese Kombinationstherapien für unterschiedliche Tumoren, sowohl Weichteilsarkome, als auch andere Tumorarten, in mehreren klinischen Studien untersucht. Beispielsweise konnten Romanowski et al. in einer Phase-II-Studie von pädiatrischen Ewing- und Weichteilsarkomen, verbesserte Tumoransprechraten zeigen (ROMANOWSKI et al., 1993), was Wendtner et al. auch in einer Studie mit retroperitonealen und viszeralen Hochrisiko-Weichteilsarkomen bei adulten Patienten nachweisen konnten (WENDTNER et al., 2002). In mehreren Studien über lokal fortgeschrittene Weichteilsarkome konnten Issels et al. erfolgsversprechende Daten zeigen (ISSELS et al., 1991; ISSELS et al., 2001). Der Nachweis, dass die Kombination aus regionaler Hyperthermie und prä- und postoperativer Chemotherapie effektiver als eine alleinige chemotherapeutische Behandlung von Hochrisiko-Weichteilsarkomen beim Menschen ist, wurde von Issels et al. in der ersten großen randomisierten Phase-III-Multicenter-Studie erbracht (ISSELS et al., 2010). In der Studie wurden sowohl Patienten mit Primärtumoren, als auch Patienten mit Rezidiven behandelt. Die Patienten wurden in zwei Therapiegruppen aufgeteilt, wobei die erste Gruppe Chemotherapie in Kombination mit regionaler Hyperthermie erhielt und bei der anderen Gruppe wurde nur Chemotherapie verabreicht. Patienten der Kombinationsgruppe wiesen signifikant bessere krankheits- und progressionsfreie Überlebenszeiten auf (ISSELS et al., 2010).

Auch in anderen Studien konnten die verbesserten Ergebnisse aus der kombinierten Therapie von regionaler Hyperthermie, Strahlentherapie und Chemotherapie nachgewiesen werden (FALK & ISSELS, 2001).

Eine neoadjuvante Verabreichung von Chemotherapie und Hyperthermie weist im Vergleich zu einer postoperativen Gabe einige Vorteile auf. Durch Größenveränderungen des Tumors kann ein Ansprechen auf die Therapie aufgezeichnet werden und prognostische Informationen können gewonnen werden. Der Primärtumor kann „downgestaged“ werden und zuvor inoperable Läsionen können mit der präoperativen Gabe operabel werden (SCHLEMMER et

al., 2003). In einer Studie von Schlemmer et al. konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit einem mikroskopischen Tumorrest vor Beginn der Kombinationstherapie, ein signifikant höheres Risiko eines Rezidives aufwiesen, im Vergleich zu Patienten welche die Kombinationstherapie bereits vor einer operativen Entfernung des Tumors erhalten hatten (SCHLEMMER et al., 2003).

Weiterhin konnte der vorteilhafte Effekt der Hyperthermie in Kombination mit Strahlentherapie belegt werden, beispielsweise führte diese Kombination beim Zervixkarzinom zur besseren lokalen Tumorkontrolle sowie zu längeren Überlebenszeiten (VAN DER ZEE et al., 2000).

3.5. Veterinärmedizinischer Einsatz der Hyperthermie

In der Veterinärmedizin hat sich, anders als in der Humanmedizin, die Hyperthermie als ein regelmäßiger Bestandteil der Tumorthherapie noch nicht vollständig durchgesetzt.

Der biologische Effekt der Hyperthermie auf Zellebene wurde zuerst in Nagern mit unterschiedlichen experimentell implantierten Tumoren untersucht. Weiterhin wurde die Wirkstofffreisetzung und -verteilung von arzneimittelbeladenen Liposomen ebenfalls in Nagern erforscht. In einem Fibrosarkom-Ratten-Modell konnten siebenfach höhere intratumorale DOX-Konzentrationen und signifikant häufigere Tumolvolumenreduktionen aufgezeichnet werden, nachdem DOX-beladene TSL systemisch appliziert worden waren (SCHMIDT, 2011).

Hyperthermie von kaninen Tumoren ruft die gleichen synergistischen Effekte wie beim Menschen hervor. Gillette et al. dokumentierte eine bessere lokale Tumorkontrolle von kaninen Weichteilsarkomen durch eine Kombination aus Strahlentherapie und Hyperthermie, im Vergleich zu einer alleinigen Strahlentherapie. Es wurden keine vermehrten Toxizitäten beobachtet (GILLETTE et al., 1992). Hauck et al. führten eine Phase-I-Studie bei Hunden mit spontan entstandenen Tumoren durch, bei welcher LTSL mit eingeschlossenem DOX simultan zur regionalen Hyperthermie appliziert wurde. Eine deutlich höhere Ansprechrate von 30%, im Vergleich zur 22% mit einer Monotherapie mit DOX, konnte aufgezeichnet werden, obwohl dies kein primärer Endpunkt der

Studie war (OGILVIE et al., 1989; HAUCK et al., 2006).

Die applizierte Wärmedosis steht bei bestrahlten kaninen Weichteilsarkomen in direkter Verbindung zu der Dauer der lokalen Tumorkontrolle (THRALL et al., 2005). Dieses Phänomen ist auch bei oberflächlichen Tumoren beim Menschen bekannt (JONES et al., 2005). In einer anderen Studie stellten Thrall et al. fest, dass die Verteilung der Wärmedosis über wenige Fraktionen bei höheren Temperaturen zu besseren Ergebnissen führte, als wenn die Dosis über mehrere Fraktionen hinweg mit niedriger Temperatur appliziert wurde (THRALL et al., 2012).

Über die Hyperthermie bei der Katze wurden erst wenige Daten veröffentlicht. In einer Studie wurde die Anreicherung von nicht thermosensitiven Liposomen, welche mit Technetium-99-m beladen waren, im Tumorgewebe und in einigen Organen untersucht. Die Untersuchungen wurden unter normothermen Bedingungen und 60 Minuten nach einer Hyperthermie-Applikation durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die intratumorale Anreicherung der Liposomen nach der Hyperthermie um den Faktor 13 angestiegen war, in Vergleich zu normothermen Bedingungen (MATTEUCCI et al., 2000). Zimmermann setzte das DPPG₂-TSL-DOX mit niedrigen Dosen, in Bereich von 0,1-0,4 mg/kg, in Kombination mit RHT bei inoperablen FISS ein. Bereits bei diesen Dosen konnte ein Tumoransprechen bei akzeptablen lokalen Nebenwirkungen aufgezeichnet werden (ZIMMERMANN, 2014).

4. Toxizität

4.1. Hyperthermie

Auftretende Nebenwirkungen werden meistens durch die in Kombination mit der Hyperthermie durchgeführte Therapie hervorgerufen. Allerdings können diese durch die Hyperthermie verstärkt werden (BRUGGMOSER et al., 2012). Das Hauptrisiko bei der Durchführung einer Hyperthermie ist eine ungewollte Temperaturerhöhung im gesunden Gewebe. Liegt die erreichte Temperatur unter 44 °C sind beim Menschen Empfindungsstörungen, Schmerzen, Hautirritationen

bis hin zu einem lokalen Ödem dokumentiert. Der Bolus des Applikators kann Druckschmerz ausüben. Eine langanhaltende Überhitzung kann zu Gewebeschädigungen und letztlich Nekrose führen (BRUGGMOSER et al., 2012). Der Schwellenwert für diese irreversiblen Schädigungen liegt bei 44 bis 46 °C, ist aber vom Gewebe abhängig (HAVEMAN et al., 2003; YARMOLENKO et al., 2011).

Spezifische Nebenwirkungen hervorgerufen durch eine Hyperthermie werden anhand von CTCAE (Common Toxicity Criteria Adverse Events) und QMHT (Quality Management in Hyperthermia) klassifiziert. Hierbei wird zwischen akuten, subakuten und späten Nebenwirkungen unterschieden. Akute Nebenwirkungen treten während der Therapie auf und beinhalten Hautschmerz, Hotspots und Druck durch den Bolus. Subakute Nebenwirkungen können bis einschließlich 6 Monate nach Beendigung der Therapie auftreten und beinhalten Hautschmerz, Ödem und Verbrennungen. Treten diese Nebenwirkungen später als nach 6 Monaten auf, werden diese zu den späten Nebenwirkungen gezählt (BRUGGMOSER et al., 2012).

4.2. Liposomen

4.2.1. Systemische Toxizität

Liposomen besitzen die gleiche Größe wie Nanobakterien und können vom Immunsystem als fremd erkannt werden. Wenn dies passiert, können mehrere unerwünschte Reaktionen, wie ein Hypersensitivitätssyndrom, ausgelöst werden. Diese entstandene Pseudoallergie (C activation-related pseudoallergy, CARPA) ist eine der wichtigsten Reaktionen. Diese Reaktion ist meistens mild und transient, kann aber auch schwerwiegend sein und mit dem Tod enden (SZE BENI et al., 2011).

Eine Reaktion auf die Liposomen wird vor allem bei der ersten Applikation gleich zu Beginn der Gabe erwartet, möglich ist aber auch ein Auftreten während der zweiten oder dritten Therapiesitzung. Die Reaktionen betreffen vor allem das Herzkreislauf- und Respiratorische System in Form von anaphylaktoiden Reaktionen. Berichte über neuropsychosomatische Symptome beim Menschen liegen ebenfalls vor (SZE BENI et al., 2011). Wenn eine Reaktion auftritt, sollte

die Infusionsrate des Medikaments herabgesetzt werden, in schweren Fällen muss die Infusion gestoppt und der Patient symptomatisch therapiert werden (LENZ, 2007; SZEBENI et al., 2011).

Bei Katzen, die auf Grund ihres Fibrosarkoms, liposomales DOX in Form des Doxil® erhielten, konnten bei 17% der Patienten anaphylaktische Reaktionen beobachtet werden (POIRIER et al., 2002). In einer anderen Studie wurden Katzen vor der Applikation mit Prednisolon prämediziert und es traten keine anaphylaktoiden Reaktionen auf (KLEITER et al., 2010).

Anaphylaktische Reaktionen wurde bei Hunden mit Tumoren unterschiedlicher Genese beobachtet, die DOX-LTSL simultan zur lokalen Hyperthermie appliziert bekamen. Durch eine Prämedikation mit Antihistaminika und Steroiden konnten diese Reaktionen unterdrückt werden. In dieser Studie wurde außerdem die maximal tolerierte Dosis untersucht, welche knapp unter der vom freien DOX lag. (HAUCK et al., 2006).

4.2.2. Lokale Toxizität

Es ist nachgewiesen, dass liposomales Doxorubicin beim Menschen zum palmar-plantaren Erythrodysästhesie-Syndrom, auch Hand-Fuß-Syndrom genannt, führen kann. Die Ursache liegt wahrscheinlich an einer verstärkten Extravasation der Liposomen im Hand- und Fußbereich, die in größerem Ausmaß beansprucht werden als andere Körperteile (GORDON et al., 1995; LYASS et al., 2000). Ein solche Reaktion konnte ebenfalls beim Hund dokumentiert werden (HAUCK et al., 2006). 22% der Katzen, die liposomales DOX erhielten, entwickelten kutane Reaktionen. Diese kamen in Form von Alopezie, Hyperpigmentation, Erythem und Papeln, vor allem periocular und an distalen Gliedmaßen, vor. Diese Veränderungen traten nach mehreren Applikationen auf, waren nicht schmerzhaft und verhinderten nicht die weitere Behandlung (POIRIER et al., 2002).

4.3. Doxorubicin

Doxorubicin wird als Chemotherapeutika bei einigen Tumoren der Katze routinemäßig eingesetzt. Häufig gesehene Nebenwirkungen sind Nausea und Anorexie, welche in einer Gewichtsabnahme resultieren. Zytopenien, wie Neutropenien und Thrombozytopenien, können durch eine direkte Schädigung des

Knochenmarkes entstehen. Auftreten von Anämien und Niereninsuffizienzen sind auch möglich, allerdings meistens erst nach mehrfachen Applikationen. Die kumulative Dosis für solche chronischen Nebenwirkungen des DOX liegt bei einer Gabe von 180 bis 240 mg/m² (MAULDIN et al., 1988; O'KEEFE et al., 1993; KENT, 2013). Kardiale Nebenwirkungen, wie akut einsetzende Arrhythmien und chronische Schädigungen des Herzmuskels, sind bei Katzen nicht dokumentiert.

5. Pharmakokinetik

Wird freies DOX intravenös appliziert führt dies zu einer schnellen Verteilung des DOX zwischen Plasma und Gewebe. Nach einiger Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den beiden Kompartimenten ein. Dieser Zustand kann anhand eines Mehr-Kompartiment-Modells beschrieben werden. Durch die Metabolisierung und Exkretion über die Nieren kommt es zur raschen Elimination des DOX aus dem Plasma und damit aus dem Körper. Folglich ist der Wert der ersten Eliminationshalbwertszeit, t_{α} , niedrig. Durch die Elimination aus dem Blutplasma diffundiert das im Gewebe vorhandene DOX entlang des Konzentrationsgradienten zurück in das Blutplasma. Danach folgt die Elimination wie zuvor beschrieben, was zu einem längeren zweiten Eliminationshalbwert, t_{β} , führt. Dementsprechend gering ist die AUC (Area under the curve) (ALLEN, 2007).

Wird statt freiem DOX eine liposomale Formulierung intravenös verabreicht, befindet sich das eingeschlossene DOX vor allem im Blutgefäßsystem. Mathematisch entspricht dies einem Ein-Kompartiment-Modell. Eine Diffusion ins Gewebe wird durch die Größe der Liposomen beschränkt. Die rasche Elimination durch die Aufnahme in die Zellen des RES überwiegt die Diffusion ins Gewebe, bis die Aufnahmekapazität dieser Zellen erreicht ist. Wird eine Oberflächenveränderung der Liposomen vorgenommen, kann diese Elimination verzögert werden, da die Erkennbarkeit durch den Organismus vermindert wird. Nachdem die Aufnahmekapazität des RES erreicht ist, folgt die Verteilung und Elimination des DOX, wie bereits für freies DOX beschrieben. In diesem Fall beschreibt t_{α} die Elimination durch das RES, t_{β} beschreibt die Elimination nach

der Sättigung des RES. Die AUC ist größer als bei einer Verabreichung von freiem DOX (ALLEN, 2007).

Schmidt konnte anhand von Pharmakokinetikuntersuchungen mit DPPG₂-TSL-DOX an der Ratte nachweisen, dass die Pharmakokinetik dieser Formulierung mit der des Ein-Kompartiment-Modells übereinstimmt (SCHMIDT, 2011).

6. Dosisfindungsstudie

6.1. Definition

Ein neues Medikament muss in unterschiedlichen wissenschaftlichen Phasen nach der EU-Richtlinie 2001/82/EG geprüft werden, um eine Zulassung zu erhalten.

In der Phase-0-Studie (präklinische Phase) wird in vitro die Pharmakodynamik und -kinetik des Medikaments in subtherapeutischen Dosen untersucht. Nach erfolgreichem Abschluss dieser Phase folgt die Phase-I-Studie, in welcher die maximal verträgliche Dosis ermittelt wird. Außerdem finden weitere Pharmakodynamische und -kinetische Untersuchungen statt. In einer folgenden Phase-II-Studie wird das Therapiekonzept überprüft und mit der geeigneten Dosis wird die Wirksamkeit des Medikamentes bestimmt. In der Phase-III-Studie wird das neue Medikament mit einer etablierten Standardtherapie verglichen. Wenn der Wirkungsnachweis erbracht wurde, kann das Medikament zugelassen werden. Eine Phase-IV-Studie kann nach einer Zulassung folgen, um beispielsweise sehr seltene Nebenwirkungen feststellen zu können.

Erreicht ein neues Medikament die erste Phase, liegt die Chance auf eine Zulassung, laut einer Food and Drug Administration (FDA)-Publikation von 2004, nur bei 8%. Die Ursache ist in vielen Fällen eine geringe Wirksamkeit oder unvorteilhafte Pharmakokinetik des Medikaments im Menschen (KUBINYI, 2003). Die in Tierversuchen erhobenen Toxizitätsdaten weisen eine hohe Übereinstimmung mit denen des Menschen auf. Deswegen wird das Auftreten von unerwarteten Nebenwirkungen im Menschen nur in 10% der Fälle als Ursache gefunden (GREAVES et al., 2004).

Dem ersten Einsatz des Medikamentes DPPG₂-TSL-DOX gingen Phase-0-Untersuchungen im Kälber- und humanem Serum voraus. Weitere Untersuchungen wurden in einer Nagerstudie durchgeführt, außerdem wurde das Medikament in einem Rattenmodell mit implantierten Tumoren eingesetzt (SCHMIDT, 2011). Es folgten in-vitro-Untersuchungen am Katzenplasma, bevor das Medikament Einsatz bei der Katze fand. Zimmermann untersuchte die Pharmakokinetik, Verträglichkeit und Wirksamkeit des Medikaments bei steigender Dosis von 0,1 bis einschließlich 0,4 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX (ZIMMERMANN, 2014).

6.2. Zielpunkte der Studie

Zimmermann hat bewiesen, dass die Verabreichung von DPPG₂-TSL-DOX, simultan zur regionalen Hyperthermie bei Katzen mit einem Fibrosarkom, praktikabel und durchführbar ist. In dieser Studie wurde die maximal tolerierte Dosis (MTD) nicht erreicht (ZIMMERMANN, 2014).

Ziel der vorliegenden Studie ist es die Dosis von DPPG₂-TSL-DOX, simultan zu regionaler Hyperthermie bei Katzen mit einem Fibrosarkom, weiter zu steigern um die MTD zu erreichen.

Dementsprechend waren die primären Endpunkte die Evaluierung der Toxizität und Pharmakokinetik sowie die Bewertung der Effektivität der Therapie und des Therapieerfolges während der Dosisescalation. Zudem wurde auf die Praktikabilität und Durchführbarkeit geachtet.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Patientenauswahl

1.1. Selektion der Patienten

Elf Katzen in Privatbesitz, mit zytologisch oder histologisch bestätigter Diagnose eines Fibrosarkoms am Rumpf wurden nach Präsentation in der Abteilung für Onkologie an der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München in die Studie aufgenommen. Sieben der Patienten wiesen einen Primärtumor auf, die restlichen vier Patienten wurden mit einem Tumorrezidiv präsentiert.

Ein Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (AZ: 55.2.-1-54-2532-154-11) wurde gestellt und genehmigt.

1.2. Aufnahme- und Ausschlusskriterien

Klinisch gesunde Katzen mit einem fortgeschrittenen, am Rumpf lokalisierten, Fibrosarkom wurden in die Studie aufgenommen, wobei die zu erwartende Überlebenszeit mindestens sechs Monate betragen sollte. Ab Patient # VI wurden nur Patienten in die Studie aufgenommen, bei denen der Tumordurchmesser nicht mehr als fünf cm betrug, da dies eine optimale Größe für das verwendete Hyperthermiegerät ist.

Katzen mit einer Felines Leukämievirus (FeLV)-Infektion, einer bekannten Herz- oder Nierenerkrankung, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Ein Tumorrezidiv innerhalb eines zuvor bestrahlten Körperabschnitts führte zur Nichtaufnahme in die Studie. Das Risiko lokaler Nebenwirkungen für die vorbehandelte Haut wäre wahrscheinlich höher gewesen, da die vorbehandelte Haut in Vergleich zur nicht vorbehandelten Haut dünner ist. Ein Tumor im Gliedmaßenbereich stellte ein weiteres Ausschlusskriterium dar, da bei dieser Lokalisation eine Gliedmaßenamputation die Therapie der Wahl darstellt. Katzen, die mit Metastasen vorgestellt wurden, konnten ebenfalls nicht in die Studie aufgenommen werden, weil eine Behandlung von Metastasen mit dieser Therapie nicht möglich ist.

2. Eingangsuntersuchungen

Vor Therapiebeginn wurde jede Katze gründlich untersucht. Diese Untersuchungen dienten einerseits als Tumorscreening, andererseits auch dem Ausschluss eventueller tumorunabhängiger Erkrankungen. Es wurden folgende Bestimmungen durchgeführt: Blutbild, Differentialblutbild, klinische Serumchemie und Gesamtthyroxin. Der Thorax wurde in drei Ebenen geröntgt, und das Abdomen ultrasonographisch untersucht. Eine ultrasonographische Untersuchung des Herzens, sowie die Erstellung eines Elektrokardiogramms wurden ebenfalls durchgeführt. Die speziellen Untersuchungen am Tumor waren Größenbestimmung mittels einer elektronischen Schieblehre (Brown&Shape, TESA, Schweiz) sowie ein PET-MRT (Biograph mMR, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn. 3,0 Tesla). Mittels der Aufnahmen aus der PET-MRT konnte das vollständige Tumorausmaß ermittelt werden. Als Pharmakon wurde das FDG (^{18}F -Fluordesoxyglucose) benutzt. Patient # IV und # V aus der zweiten Dosisgruppe stellten eine Ausnahme dar. Bei diesen Patienten wurde statt einer PET-MRT ein MRT (1.5 Tesla Magnetom, Symphony, Siemens Health Care, Erlangen) durchgeführt. Die Daten aus der PET-MRT bzw. MRT waren essentiell bei der individuellen Vorbereitung des Patienten Set up inklusive Patientenlagerung und Applikatorpositionierung am Tumor. Die Auswertung der PET-MRT ist kein Bestandteil dieser Arbeit.

3. Dosiseskulation

Die eingeschlossenen Katzen wurden in drei verschiedene Therapiegruppen aufgeteilt: In die erste Gruppe wurden drei Katzen (# I-III) eingeschlossen. Diese Patienten erhielten 0,6 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX. Eine Ausnahme stellt Patient # III dar, welcher bei der letzten Sitzung auf Grund von Tumorprogression einmalig eine Dosis von 0,8 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX erhielt.

In der zweiten Therapiegruppe wurden vier Katzen eingeschlossen (# IV-VII) und die Dosierung von DPPG₂-TSL-DOX wurde auf 0,8 mg/kg erhöht. In der letzten Gruppe wurden ebenfalls vier Katzen eingeschlossen (# VIII-XI), welche 1,0

mg/kg DPPG₂-TSL-DOX bekamen. Diese Dosierung entspricht der Standarddosierung von freiem DOX.

4. Therapieprotokoll¹

Für die Katzen in der ersten und zweiten Gruppe waren sechs Behandlungszyklen in zweiwöchigem Abstand vorgesehen. Jeder Behandlungszyklus beinhaltete die Applikation von DPPG₂-TSL-DOX streng i.v. über 15 Minuten simultan zur regionalen Hyperthermie. Die Pharmakokinetik der Liposomen unter Einfluss der Hyperthermie wurde in der ersten und zweiten Dosisgruppe während einer Sitzung mitbestimmt.

Eine Ausnahme stellten die Patienten # IV und #V der zweiten Dosisgruppe dar. Für diese Patienten waren, genauso wie für die Patienten der dritten Dosisgruppe sieben Behandlungszyklen in zweiwöchigen Abstand vorgesehen. Bei der ersten Sitzung erfolgte die alleinige Applikation des DPPG₂-TSL-DOX, um die Verträglichkeit des Medikaments zu prüfen und um die Pharmakokinetik der DPPG₂-TSL-DOX ohne den Einfluss der Hyperthermie zu untersuchen, da eine hohe Dosierung gewählt worden war. Bei den folgenden sechs Sitzungen erfolgte die Applikation des DPPG₂-TSL-DOX simultan zu regionaler Hyperthermie. Eine pharmakokinetische Untersuchung der Liposomen in vivo erfolgte während der ersten und zweiten Sitzung.

4.1. Kontrolluntersuchungen während der Therapie

Eine Kontrolle des Blutbildes mit Differentialblutbild, sowie des Serum-Organprofils inklusive Serumelektrolyte wurde am Tag der Therapie, sowie 7 Tage später durchgeführt. Außerdem wurden zu diesen Zeitpunkten eine klinische Allgemeinuntersuchung, sowie eine manuelle Ausmessung des Tumors vorgenommen.

¹ Übersichtstabelle, Anhang Kapitel 2, Seite 88

Die PET-MRT wurde nach zwei Therapiesitzungen mit DPPG₂-TSL-DOX und RHT wiederholt. Bei der dritten Dosisgruppe wurde während der ersten Therapiesitzung nur das DPPG₂-TSL-DOX appliziert, deswegen fand die PET-MRT erst nach drei Therapiesitzungen statt. Diese Untersuchung wurde durchgeführt, um das Tumoransprechen zu verifizieren. Bei Patient # IV und # V wurde auf ein Kontroll-MRT verzichtet.

4.2. Untersuchungen nach Abschluss der Therapie

Nach Abschluss der Therapie wurde ebenfalls eine Kontrolle des Blutbildes, Differentialblutbildes sowie der Serumparameter durchgeführt. Es folgten Röntgenaufnahmen des Thorax in drei Ebenen, eine sonographische Untersuchung des Abdomens sowie des Herzens. Diese Untersuchungen dienten einerseits als Re-Staging, andererseits auch dem Ausschluss von eventuellen tumorunabhängigen Erkrankungen, die im Laufe der Therapie entstanden sein könnten. Die PET-MRT, bzw. MRT (# IV und # V) im Rahmen der Abschlussuntersuchung diente zum einen der Beurteilung des Tumoransprechens, zum anderen der Planung der chirurgischen Exzision solcher Tumoren, welche operativ entfernt werden konnten.

5. Durchführung der regionalen Hyperthermie

Alle Patienten wurden mit DPPG₂-TSL-DOX simultan zu regionaler Hyperthermie therapiert. Die Gesamtdauer der Hyperthermie simultan zu DPPG₂-TSL-DOX betrug 60 min.

Für die regionale Hyperthermie wurde ein BSD Medical Controlling System mit einem Oberflächenapplikator (MA-151 Mini Dual Ridge Hyperthermia Applicator, BSD Medical Corporation, Salt Lake City, USA) verwendet. Dieser speziell für die Therapie von oberflächlichen Läsionen entwickelte Applikator weist eine Eindringtiefe von ungefähr 2,5 Zentimeter auf.

Es wurden Temperatursonden innerhalb des Tumors als auch an der Oberfläche des Tumors angebracht, gemäß den Richtlinien zur Qualitätssicherung in der Hyperthermie (BRUGGMOSER et al., 2012). Eine Bormann-Sonde wurde intratumoral implantiert. Die Sonde wurde in Basisnähe geschoben, von ventral nach dorsal, um die Temperaturschwankungen möglichst akkurat erfassen zu können. Eine nicht-invasive Sonde wurde im rechten Winkel zu der intratumoralen Temperatursonde an der Haut angebracht (siehe **Abbildung 1** und **2**). Rektal sowie ösophageal wurden zusätzliche Sonden platziert um die Überwachung der Körpertemperatur zu gewährleisten. Eine manuelle Bewegung der intratumoralen Sonde entlang des Einführungskanals gewährleistete eine Temperaturkontrolle von mehreren Bereichen des Tumors.



Abbildung 1 (links): Intratumorale- und Hauttemperatursonde im rechten Winkel zueinander. **Abbildung 2 (rechts):** Der Applikator wird darüber angebracht.

Die Temperaturdaten wurden in einminütigen Intervallen automatisch aufgezeichnet. Eine möglichst konstante Erwärmung des Tumorgewebes wurde insofern gewährleistet, als die Energie, die benötigt wurde um dem Tumor auf eine bestimmte Temperatur zu erwärmen, anhand des zuletzt gemessenen Temperaturwerts automatisch angepasst wurde. Die erwünschte Hauttemperatur lag zwischen 35 und 38 °C, die maximal erlaubte bei 39 °C. Die Regulation der Hauttemperatur erfolgte über den Bolus des Applikators. Der mit destilliertem Wasser gefüllte Bolus ist an ein Kühlungssystem angeschlossen. Durch die Veränderung der zirkulierenden Wassertemperatur und durch den Füllungsstatus des Bolus kann die Haut vor schädlichen Temperaturen geschützt

werden. Der optimalen Wirkung des Bolus dient außerdem eine akkurate Ankopplung des Applikators an den Tumor, damit eine einwandfreie Wärmeübertragung der Hochfrequenz-Energie stattfinden kann (siehe **Abbildung 3** und **4**).



Abbildung 3 und **4**: *Set up einer Therapiesitzung mit dem BSD Medical Controlling System.*

5.1. Aufwärmphase

Der Tumor wurde auf die jeweils festgelegte Zieltemperatur erwärmt. Patienten in der ersten und zweiten Dosisgruppe, welche ein größeres Tumolvolumen aufwiesen, wurden mit einer etwas höheren individuellen Zieltemperatur von 45 °C therapiert, damit die eigentliche Zieltemperatur von 42 °C in möglichst großen Anteilen des Gesamttumors erreicht wurde. In diesen Dosisgruppen wurde die Erwärmung, nach Erreichen der Zieltemperatur, für weitere 15 Minuten fortgeführt, um eine möglichst homogene Erwärmung des Gesamttumors zu gewährleisten. Im Anschluss erfolgte die Applikation des DPPG₂-TSL-DOX streng i.v. über 15 Minuten. Bei den übrigen Patienten mit einem kleineren Tumolvolumen ist alleine aufgrund der Aufwärmphase von einer homogenen Erwärmung des Tumors auszugehen, weshalb auf eine längere Erwärmung verzichtet wurde. Die Applikation des DPPG₂-TSL-DOX erfolgte, sobald die Zieltemperatur von 42 °C erreicht worden war.

6. Liposomen: Herstellung und Charakterisierung

Die Herstellung der Liposomen orientierte sich an bereits publizierten Methoden (HOSSANN et al., 2007; HOSSANN et al., 2010). Die Phospholipide 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DPPC) / 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin (DSPC) / 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphodiglycerin (DPPG₂) wurden im molaren Verhältnis 50:20:30 (mol/mol) in Chloroform in einem Rundkolben gelöst und das Lösungsmittel in einem Rotationsverdampfer entfernt. Es entstand ein homogener Lipidfilm, der für mindestens 2 Stunden bei 10 mbar und 60°C getrocknet wurde, um Reste des Chloroforms zu entfernen. Der Lipidfilm wurde mit 300 mM Citrat pH 4 (finale Lipidkonzentration 50 mM) hydratisiert und für maximal 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Die entstandenen Vesikel wurden anschließend mit Hochdruckextrusion (LIPEXTM, Northern Lipids Inc. Burnaby, BC, Canada) bei 60°C insgesamt 10 Mal durch 2 Polykarbonatfilter (Whatman, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) der Porengröße 200 nm filtriert. Bis einschließlich Charge 24/16D wurde der pH Gradient zur Beladung der Liposomen mit Doxorubicin durch Säulenchromatographie erzeugt. Dabei wurde zum Eluieren der Liposomen 20 mM HEPES, 150 mM NaCl (HN-Puffer) pH 7,8 verwendet. Bei allen weiteren Chargen wurde der Gradient durch Titration mit 1 M NaHCO₃ pH 8 erzeugt. Die aktive Beladung mit Doxorubicin erfolgte dann nach Zugabe des Wirkstoffs im molaren Wirkstoff zu Lipid Verhältnis von 0,13 (Lipidkonzentration 3 mM) und anschließende Inkubation bei 37°C für maximal 60 Minuten. Durch Zentrifugation (75.000 xg) wurden die Liposomen sedimentiert, der Überstand entfernt und die Liposomen in HN-Puffer pH 7,4 resuspendiert.

Die Liposomen wurden umfassend durch publizierte Methoden charakterisiert (HOSSANN et al., 2007; HOSSANN et al., 2010). Dies beinhaltete dynamische Lichtstreuung zur Bestimmung der Vesikelgröße und Größenverteilung (Polydispersionsindex, PDI) und die Fluoreszenzspektroskopie (DOX-Gehalt, Temperatur- und Zeitabhängige Freisetzung von DOX in Puffer bzw. fetalem Kälberserum). Weiterhin wurde die Lipidkonzentration durch eine Phosphatbestimmung und die Zusammensetzung durch Dünnschichtchromatographie gemessen. Es wurden nur diejenigen Chargen für

die Studie verwendet, die innerhalb der Spezifikationen für die analytischen Parameter lagen.

Insgesamt wurde 14 verschiedenen Chargen mit DPPG₂-TSL-DOX in der Studie eingesetzt. Die Eigenschaften der verschiedenen Chargen sind im Anhang Kapitel 4, Seite 92 aufgeführt.

7. Anästhesie

Die Therapiesitzungen, sowie die PET-MRT bzw. MRT, wurden in Vollnarkose durchgeführt, damit eine permanente Ruhighaltung der Patienten gegeben war. Die Narkosen wurden während der Therapiesitzungen nach einem standardisierten Studienprotokoll durchgeführt. Für die bildgebenden Untersuchungen wurde ein anderes einheitliches Narkoseprotokoll verwendet.

7.1. Infusion

Die Patienten erhielten ein bis zwei Stunden vor Beginn der Narkose eine Infusion mit Sterofundin® (B. Braun, Melsungen, Deutschland), mit einer Infusionsrate von 10 oder 15 ml/kg/h. Eine Flüssigkeitsgabe vor der Narkose diente der Volumenauffüllung um die Blutentnahmen für die Pharmakokinetikuntersuchungen zu erleichtern und um die Nierenbelastung während der Anästhesie so gering wie möglich zu halten. Die Infusion wurde nach Beendigung der Gabe von DPPG₂-TSL-DOX mit einer Rate von 10 ml/kg/h bis zum Ende der Narkose durchgeführt.

7.2. Narkoseprämedikation und -einleitung

Die Prämedikation erfolgte mit Methadon (Comfortan®, Bladel, Niederlande) 0,2 mg/kg i.v. zehn Minuten später erfolgte die Einleitung mittels 2 mg/kg Alfaxalon (Alfaxan®, Vétoquinol, Ravensburg, Deutschland) i.v. Alle Studienpatienten wurden intubiert und die Narkose mittels Isofluran (Isofluran Baxter®, Baxter Unterschleißheim, Deutschland) aufrechterhalten.

7.3. Narkosemonitoring

Das Narkosemonitoring erfolgte mittels Elektrokardiogramm, Pulsoximetrie, Kapnographie und Blutdruckmessung. Die Blutdruckkontrolle wurde mittels einer Doppler- und einer oszillometrischen Messung ermittelt. Die Körpertemperatur wurde sowohl ösophageal als auch rektal mit Hilfe von Temperatursonden kontrolliert. Um eine Unterkühlung der Patienten zu verhindern wurde den Patienten warme Luft mit Hilfe eines Bair-Huggers zugeführt. Weiterhin wurde für das Narkosemonitoring die Lidreflexkontrolle, Schleimhautfarbe und Sauerstoffsättigung kontrolliert. Die zuvor aufgeführten Parameter wurden alle fünf Minuten protokolliert. Während der Narkoseüberwachung wurde auf eine eventuell auftretende CARPA-Reaktion besonders geachtet.

Eine Auswertung der Narkoseparameter ist kein Bestandteil dieser Arbeit.

8. Probenentnahme

8.1. Blutplasma

Einen peripheren Zugang, entweder v. *saphena medialis* oder v. *cephalica*, wurde für die Blutprobenentnahmen für die pharmakokinetische Untersuchung gewählt. Der Venenverweilkatheter (Vasofix® Braunülen®, 1,1 x 25 mm, G20, rosa, B. Braun, Puchheim/München, Deutschland) wurde in Narkose gelegt. Die Blutentnahmen erfolgten mittels einer Multivette (Multivette® 600, Sarstedt, Deutschland), wobei die erste Probe direkt vor Beginn der DPPG₂-TSL-DOX-Applikation zum Zeitpunkt 0 entnommen wurde. Die weiteren Probenentnahmen erfolgten zu den Zeitpunkten 7, 15, 30, 45, 60, 75, 105 und 135 Minuten nach Beginn der Applikation. Der Venenverweilkatheter wurde zwischen den Probenentnahmen mittels eines Mandrin (Vasofix® Mandrin, 1,1 mm, G20, rosa, B. Braun, Puchheim/München, Deutschland) verschlossen. Das Blut wurde innerhalb von 30 min zentrifugiert (4000 x g über 5 Minuten bei 4 °C), das abgetrennte Plasma zuerst bei -30°C und später bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

8.2. Tumorbiopsie

Biopsien zur Bestimmung der DOX-Konzentration im Tumor erfolgten in der ersten und zweiten Dosierungsgruppe direkt nach jeder Hyperthermieapplikation in Vollnarkose. In der Dosisgruppe III nur bei den ersten zwei Sitzungen. Die Biopsien wurden mittels eines 14 G TEMNO®-Biopsie-Systems entnommen. Es wurden drei Biopsien fächerförmig aus tieferen Schichten des Tumors entnommen. Für die Entnahmen wurde der intratumorale Temperatursondenzugang genutzt. Die Gewebeproben wurden zuerst bei -30°C und später bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

9. Pharmakokinetik

9.1. Bestimmung der DOX-Konzentration in Plasma- und Gewebeproben

Die Bestimmung der Konzentration von DOX in Plasma- und in den Gewebeproben erfolgte durch High performance liquid Chromatography (HPLC) (GALETTIS et al., 1994). Es wurde ein Waters HPLC System mit einer 515 HPLC Pumpe, 717plus Autosampler und einem 470 Fluoreszenzdetektor verwendet. Als Interner Standard wurde zu allen Proben eine definierte Menge Daunorubicin zugesetzt. Durch Flüssig/Flüssig-Extraktion mittels Chloroform/Isopropanol wurden die Proben für die Analyse vorbereitet. Die Bindung von DOX an DNA wurde durch Inkubation mit Silbernitrat-Lösung gelöst (SCHWARTZ & GRINDEY, 1973). Eine Kommerziell erhältliche DOX-Lösung (Adriblastin, Pfizer AG, Berlin, Deutschland) diene als Referenzstandard.

9.2. Berechnung der pharmakokinetischen Parameter

Die Berechnung der Fläche unter der Kurve (Area under the curve, $AUC_{0-135\text{min}}$) erfolgte aus dem Integral der gemessenen Plasma-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$) von $t = 0$ bis 135 min. Weiterhin wurde die theoretische Maximalkonzentration (ID) für DOX aus der applizierten Dosis unter der theoretischen Annahme berechnet, dass das Plasmavolumen eines Säugetiers 4 % des Körpergewichts entspricht. Die Plasma-Konzentration des Wirkstoffs, ausgedrückt als prozentualer Anteil der

maximalen Konzentration (% ID), wurde vom Ende der Infusion ($t = 15$ min) bis zum letzten gemessenen Zeitpunkt ($t = 135$ min) mit einem Zweikompartiment-Pharmakokinetik-Modell (OriginPro 8.1.5, OriginLab Corp., Northhampton, MA, USA) modelliert und die alpha- und beta-Halbwertszeiten bestimmt (LIMMER et al., 2014).

10. Evaluierung der Toxizität

Die Toxizitätsdaten wurden anhand der Veterinary Cooperative Oncology Group (VCOG-CTCAE V1.1) evaluiert. Wie von Bruggmoser et al., beschrieben, wurden die Nebenwirkungen der Hyperthermie als akut (während der Therapie), subakut (bis zu 6 Monate nach der Therapie) und spät (später als 6 Monate nach der Therapie) eingeteilt (BRUGGMOSER et al., 2012).

Eine Allgemeinuntersuchung sowie eine Blutbild- und Organwertkontrolle wurde vor jeder Therapiesitzung und bei den Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden zur Beurteilung der Toxizität herangezogen und dienten außerdem der Prüfung der Narkosefähigkeit. Auf eine Hypersensitivitätsreaktion durch die DPPG₂-TSL-DOX-Applikation wurde während der Gabe streng geachtet.

Die Patienten wurden zu einer echokardiologischen Untersuchung vor Beginn und nach Beendigung der gesamten Therapiezyklen herangezogen. Diese Untersuchung wurde durchgeführt, da DOX, bei Hund und Mensch, zu kardialen Nebenwirkungen führen kann.

11. Tumoransprechen

Das Tumoransprechen wurde durch Vergleich des Tumolvolumens von Sitzung zu Sitzung bestimmt. Bei der ersten Messung wurden individuelle Messpunkte für jede Katze definiert. Wenn möglich, wurden die Messungen immer durch dieselbe Person durchgeführt. Die manuelle Tumorvermessung erfolgte vor Beginn der einzelnen Therapiesitzungen in Narkose und bei den Kontrolluntersuchungen in

wachem Zustand. Hierfür wurde eine elektronische Schieblehre (Brown&Shape, TESA, Schweiz) verwendet. Die Parameter „Länge“, „Breite“ und „Höhe“ wurden bei jeder Messung dokumentiert und das Tumolvolumen mittels der Formel $V = \text{Länge} \times \text{Breite} \times \text{Höhe} \times \pi/6$ berechnet. Diese Formel wird normalerweise für die Berechnung von Ellipsoiden herangezogen und hat sich, für die Berechnung von Tumorumfängen bewährt (HARRINGTON et al., 2001). Das Tumorausprechen wurde gemäß den RECIST-Kriterien (response evaluation criteria in solid tumours) bestimmt (EISENHAUER et al., 2009). Eine partielle Remission wird als ein Volumenzugang um 30 % definiert. Es handelt sich um eine progressive Erkrankung bei einer Volumenzunahme um mindestens 20%. Bei dazwischen gelegenen Volumenänderungen wird von einem stabilen Krankheitsgeschehen ausgegangen.

12. Weitere Behandlungen nach der Therapiestudie

Tumoren, die durch die simultane Gabe von regionaler Hyperthermie und DPPG₂-TSL-DOX operabel geworden sind, wurden im Anschluss an der Studie exzidiert. Anschließend folgte eine Strahlentherapie, Patienten mit nicht tumorfreien Exzisionsrändern (R1) unterliefen einer palliativen Strahlentherapie (5 x 6 Gy). Patienten mit tumorfreien Exzisionsrändern (R0) bekamen eine kurative Strahlentherapie (15 x 2,5 Gy).

13. Follow up

Das Tumorausprechen wurde vier Wochen, drei Monate, sechs Monate und zwölf Monate nach Abschluss der Therapie erneut durch eine klinische Untersuchung oder einen Telefonkontakt mit dem Besitzer oder dem überweisenden praktischen Tierarzt beurteilt. Bei Katzen, welche einer operativen Exzision des Tumors unterzogen wurden, wurde eine Palpation im Bereich des Therapiegebiets durchgeführt, um Hinweise auf ein eventuelles Rezidiv zu gewinnen. Bei Tumoren, die nicht exzidiert werden konnten, wurde der Tumor ausgemessen.

Jeder in der Klinik vorgestellte Patient wurde einer klinischen Untersuchung unterzogen.

IV. ERGEBNISSE

1. Patientendaten²

Die in der Studie aufgenommenen elf Patienten aus privatem Besitz wurden zwischen Januar 2013 und Juli 2014 in der Abteilung für Onkologie der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München vorgestellt.

Acht Patienten waren männlich kastriert (# I, IV, V, VI, VIII, IX, X und XI) und drei weiblich kastriert (# II, III und VII). Das mediane Alter lag bei 10 Jahre (Varianz 6 bis 14 Jahre) und das mediane Körpergewicht bei 4,98 kg (Varianz 4,16 bis 6,80 kg). Zehn der Katzen waren Europäische Kurzhaarkatzen, bei einer Katze handelte es sich um einen Abessinier. Keine der in der Studie aufgenommenen Katzen waren strahlentherapeutisch oder chemotherapeutisch vorbehandelt.

Sieben Patienten (# I, II, V, VII, VIII, IX und XI) präsentierten sich mit einem Primärtumor. Bei den restlichen vier Patienten (# III, IV, VI und X) handelte es sich um ein Rezidiv. Von den elf Tumoren waren sechs Tumoren interskapulär gelegen (# I, II, IV, V, VI, VIII). Drei Patienten wurden mit einem Tumor auf der rechten Thoraxwand bzw. der rippengestützten Bauchwand (# III, IX, X) vorgestellt und bei zwei Patienten war der Tumor auf der linken Thoraxwand lokalisiert (# VII und XI).

Alle Dosisgruppen zusammen betrachtet lagen das mediane Tumolvolumen bei $18,4 \text{ cm}^3$ (Varianz 4,1 bis $189,8 \text{ cm}^3$) und das Durchschnittsvolumen bei $45,5 \text{ cm}^3$. Das mediane Tumolvolumen betrug $59,5 \text{ cm}^3$ (Varianz 22,2 bis $106,9 \text{ cm}^3$) und das Durchschnittsvolumen $62,9 \text{ cm}^3$ in der ersten Dosisgruppe. In der zweiten Dosisgruppe lag das mediane Tumolvolumen bei $37,3 \text{ cm}^3$ (Varianz 8,2 bis $189,8 \text{ cm}^3$) und das Durchschnittsvolumen betrug $68,2 \text{ cm}^3$. In der dritten Dosisgruppe betrug das mediane Tumolvolumen $8,5 \text{ cm}^3$ (Varianz 4,1 bis $18,4 \text{ cm}^3$) und das Durchschnittsvolumen $9,9 \text{ cm}^3$.

² Übersichtstabelle, siehe Anhang Kapitel 1, Seite 87

2. Durchgeführte Therapie

Insgesamt durchliefen acht Patienten alle geplanten Therapiesitzungen. Drei Patienten mussten die Therapie vorzeitig beenden. Insgesamt wurden 55 Sitzungen mit regionaler Hyperthermie und DPPG₂-TSL-DOX durchgeführt. Bei fünf Sitzungen wurden nur das DPPG₂-TSL-DOX appliziert.

Betrachtet man die einzelnen Dosisgruppen vervollständigten alle Patienten (# I-III) der ersten Gruppe alle geplanten Therapiezyklen. Diese Patienten wurden mit 0,6 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX behandelt.

Die Patienten in der zweiten Dosisgruppe erhielten 0,8 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX. In dieser Gruppe durchliefen zwei Patienten (# V und VI) alle geplanten Therapiezyklen. Ein Patient (# VII) hat die Therapie nach vier Sitzungen, aufgrund eines Abszesses im Tumorbereich abgebrochen. Ein anderer Patient (# IV) wurde vor der ersten Therapiesitzung aus der Studie ausgeschlossen, da er nach der ersten MRT neurologische Symptome aufwies. Eine Überlaufblase und Paraplegie wurde dokumentiert und der interskapuläre Tumor wurde als Ursache für diese Symptome gesehen. Die Katze wurde daraufhin von Haustierarzt euthanasiert.

In der dritten Dosisgruppe brach ein Patient (# IX) die Therapie nach vier Sitzungen ab, die Ursachen lagen an Veränderungen am Herzmuskel, sowie ventrikuläre Extrasystolen und einer Hypertonie. Die restlichen drei Patienten (# VIII, X, XI) erhielten alle geplanten Therapiezyklen. Diese Patienten erhielten 1,0 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX.

3. Tumoransprechen³

3.1. Dosisgruppe I

Alle Patienten erhielten die geplanten Therapiezyklen. Ein Patient (# II) zeigte mit einer Tumorreduktion um 79,8% eine partielle Remission, allerdings wies dieser Patient bei der dritten Therapiesitzung eine neue Umfangsvermehrung auf, die circa 2 Zentimeter vom Primärtumor entfernt war. Diese neue Umfangsvermehrung wurde nicht beprobt, nahm aber in den folgenden PET-MRT Radiopharmakon auf. Damit könnte es sich um eine sogenannte Satellitenmetastase handeln. Mit einer Volumenreduktion um 37,7% zeigte ein anderer Patient (# I) eine partielle Remission. Der letzte Patient (# III) in dieser Gruppe zeigte während der ersten Therapiezyklen ein Ansprechen auf die Therapie, während der nachfolgenden Therapiezyklen zeigte der Tumor eine Progression. Da der Tumor zystische Areale aufwies, wurde eine Punktion des Tumors während des vierten Therapiezyklus durchgeführt, und Flüssigkeit konnte abgezogen werden. Bei den restlichen Zyklen fand keine Punktion statt. Insgesamt konnte ein Tumorwachstum um 174,4% aufgezeichnet werden (Siehe **Abbildung 5**).

³ Übersichtstabelle, siehe Anhang Kapitel 3, Seite 91

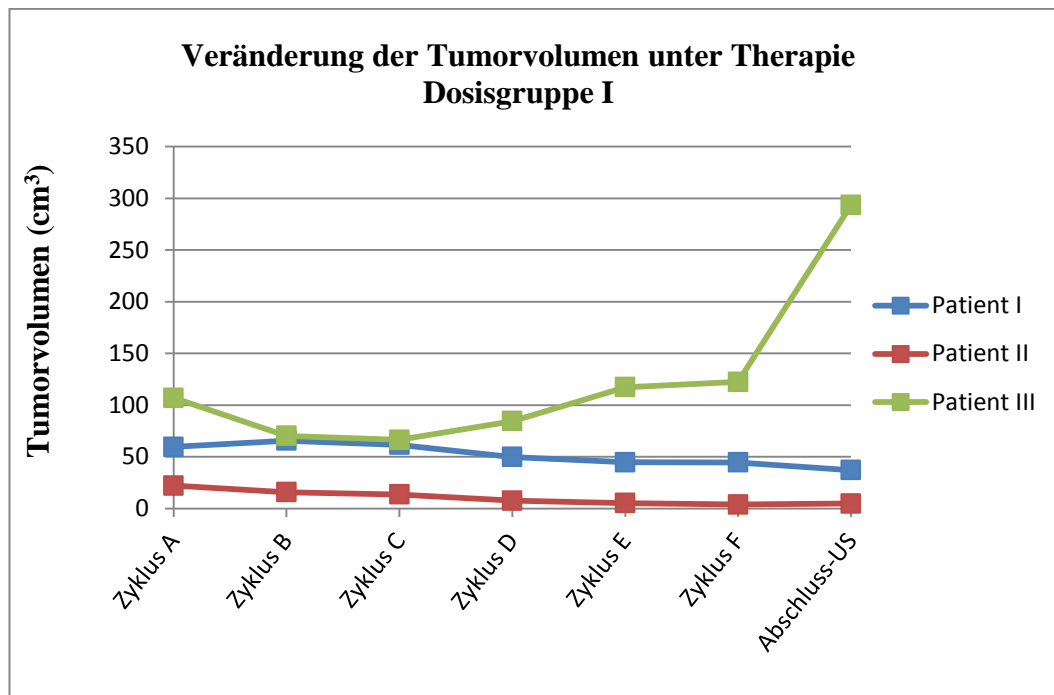


Abbildung 5: Veränderung der Tumorzellen unter Therapie in Dosisgruppe I, 0,6 mg/kg DDPG₂-TSL-DOX. Zyklus A-G: DDPG₂-TSL-DOX simultan zur RHT.

3.2. Dosisgruppe II

Bei allen Patienten, die therapiert wurden, konnte ein Therapieeffekt verzeichnet werden. Patient # V wies eine partielle Remission um 89,0% auf und Patient # VII eine partielle Remission um 84,6%. Dann entwickelte der Patient # VII einen Abszess im Tumor und die Hyperthermie-Therapie musste vorzeitig abgebrochen werden. Tumor und Abszess wurden exstirpiert. Ein stabiles Krankheitsgeschehen von 29,2% wurde bei Patient # VI dokumentiert. Patient # V zeigte eine Tumoreinblutung zur Beginn der Therapie und der Tumor wurde bis einschließlich Therapiesitzung E regelmäßig punktiert um Flüssigkeit abzusaugen. (Siehe **Abbildung 6** und **7**).

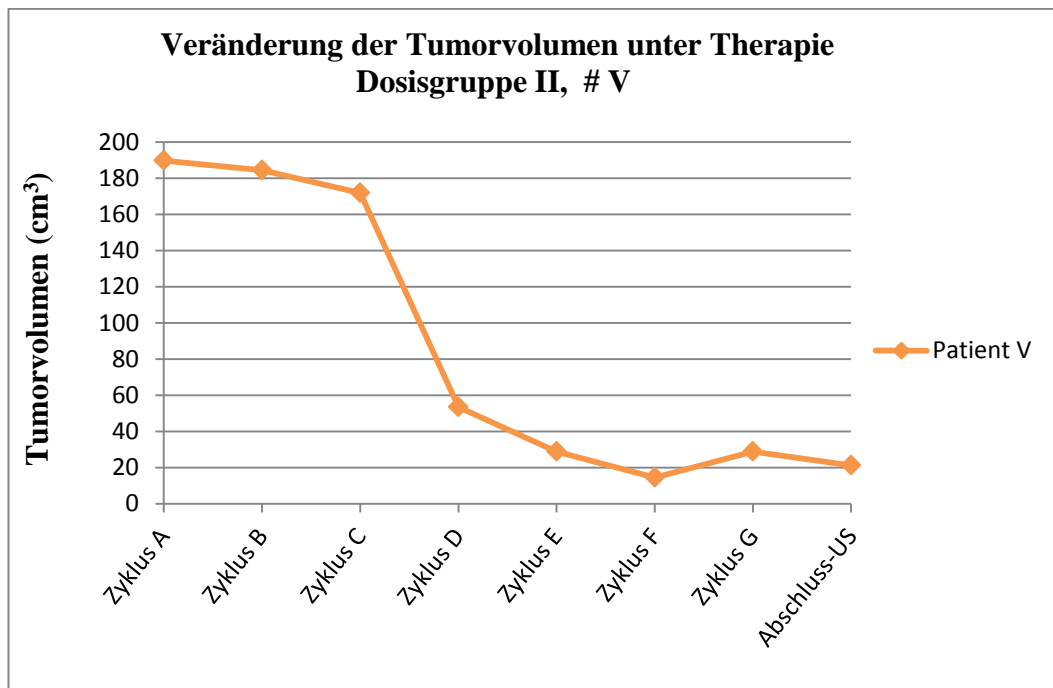


Abbildung 6: Veränderung des Tumorzellen unter Therapie von Patient # V, Dosisgruppe II, 0,8 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX. Zyklus A: nur Pharmakokinetik des DPPG₂-TSL-DOX, Zyklus B-G: DPPG₂-TSL-DOX simultan zu RHT.

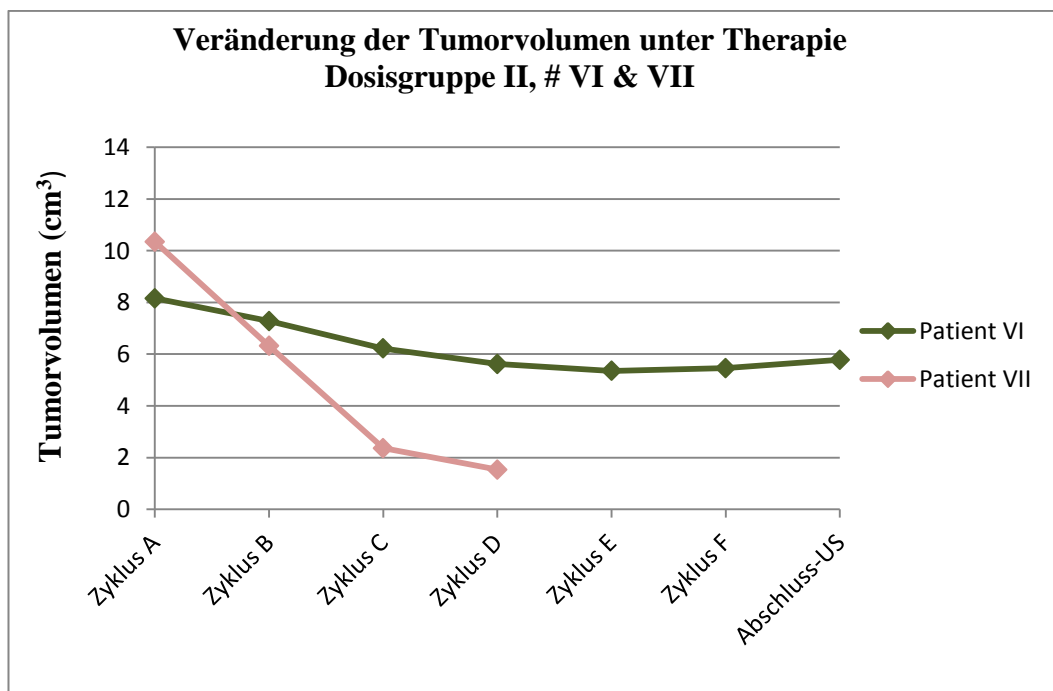


Abbildung 7: Veränderung der Tumorzellen unter Therapie von Patient # VI und # VII, Dosisgruppe II, 0,8 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX. Zyklus A-F: DPPG₂-TSL-DOX simultan zur RHT.

3.3. Dosisgruppe III

Bei allen Patienten konnte eine Tumorremission dokumentiert werden. Patient # VIII, # X und # XI wiesen eine partielle Remission um jeweils 95,4%, 43,2% bzw. 84,6% auf. Patient # IX zeigte bei der vorzeitigen Abschlussuntersuchung eine partielle Remission um 47,1 %. (Siehe **Abbildung 8**)

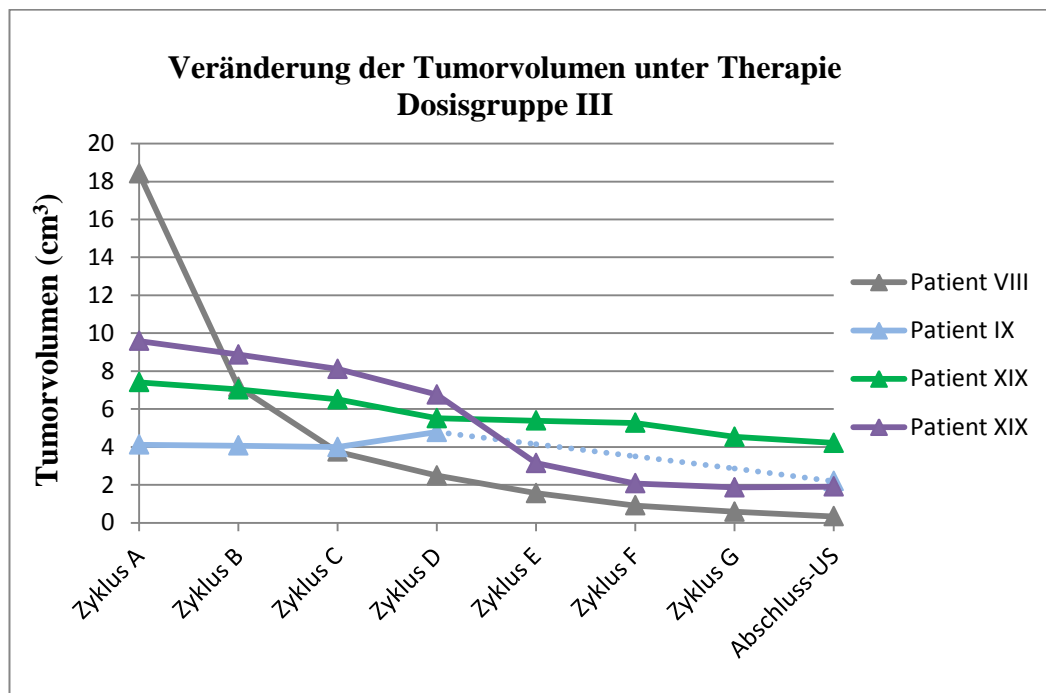


Abbildung 8: Veränderung der Tumolvolumen unter Therapie in Dosisgruppe III, 1,0 mg/kg DDPG₂-TSL-DOX. Zyklus A: nur Pharmakokinetik des DPPG₂-TSL-DOX, Zyklus B-G: DPPG₂-TSL-DOX simultan zu RHT. Patient IX brach die Therapie nach Zyklus D ab und die Abschlussuntersuchung folgte im Anschluss.

4. Hyperthermiebehandlung

Die während der Therapie, median gemessene intratumorale Temperatur (T_{50}) betrug, bezogen auf alle Patienten und Therapiezyklen, median 42,6 °C (Varianz 42,0 bis 42,9 °C). Die Temperatur welche von 90% der aufgezeichneten Temperaturmessungen mindestens erreicht oder überschritten wurde (T_{90}) betrug, auf alle Patienten und Therapiezyklen bezogen, median 41,6 °C (Varianz 41,2 bis 42,2 °C). Die Zeit welche benötigt wurde, um den Tumor auf die Zieltemperatur zu erwärmen, betrug bei allen Patienten und Therapiezyklen median 8,3 Minuten.

Während der Hyperthermietherapie stieg die systemische Temperatur bei keinem Patienten an.

Betrachtet man alle Patienten und alle Therapiezyklen zusammen, betrug der Wert für die sogenannten „Calculated equivalent minutes“ (CEM₄₃) 81,8 Minuten. Angaben zu den einzelnen Dosisgruppen, sowie eine gruppenübergreifende Übersicht, sind im Anhang aufgeführt⁴.

5. Pharmakokinetik

5.1. Plasma

In den ersten beiden Dosisgruppen wurde nur die Pharmakokinetik des DPPG₂-TSL-DOX unter Einfluss von Hyperthermie bestimmt.

In der dritten Dosisgruppe wurde die Pharmakokinetik des DPPG₂-TSL-DOX einmal ohne und einmal mit dem Einfluss der Hyperthermie bestimmt. Hier ist der Einfluss der Hyperthermie auf die thermosensitive Liposomen deutlich zu erkennen (Siehe **Abbildung 9** und **10**). Ohne Hyperthermie zirkuliert das DPPG₂-TSL mit dem eingeschlossenen Wirkstoff zum größten Teil über einen längeren Zeitraum in den Blutgefäßen. Durch die simultane Hyperthermieapplikation kommt es zur raschen Wirkstofffreisetzung und -verteilung im erwärmten Gebiet. Dieses Phänomen wird in der Abbildung durch den steilen Abfall der DOX-Konzentration im Plasma ersichtlich. Die Hyperthermieapplikation erfolgte über einen Zeitraum von 60 Minuten, was auch der Abbildung zu entnehmen ist.

Durch die Halbwertszeiten t_α und t_β wird die Kurve in zwei Teile unterteilt. Der größte Abfall der DOX-Konzentration wird durch t_α beschrieben. Dieser Abfall tritt ungefähr innerhalb der ersten 30 Minuten nach vollständiger DPPG₂-TSL-DOX-Gabe ein. Den folgenden Teil der Kurve entspricht t_β .

⁴ Hyperthermie-Daten, Anhang Kapitel 5, Seite 93

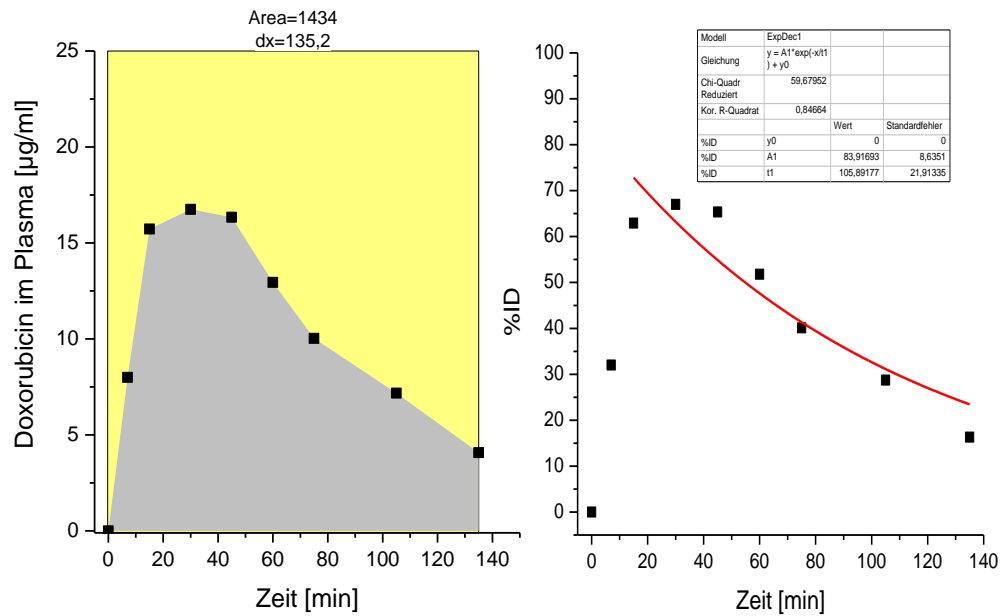


Abbildung 9: Pharmakokinetik des DPPG₂-TSL-DOX bei einer Katze ohne simultane RHT.

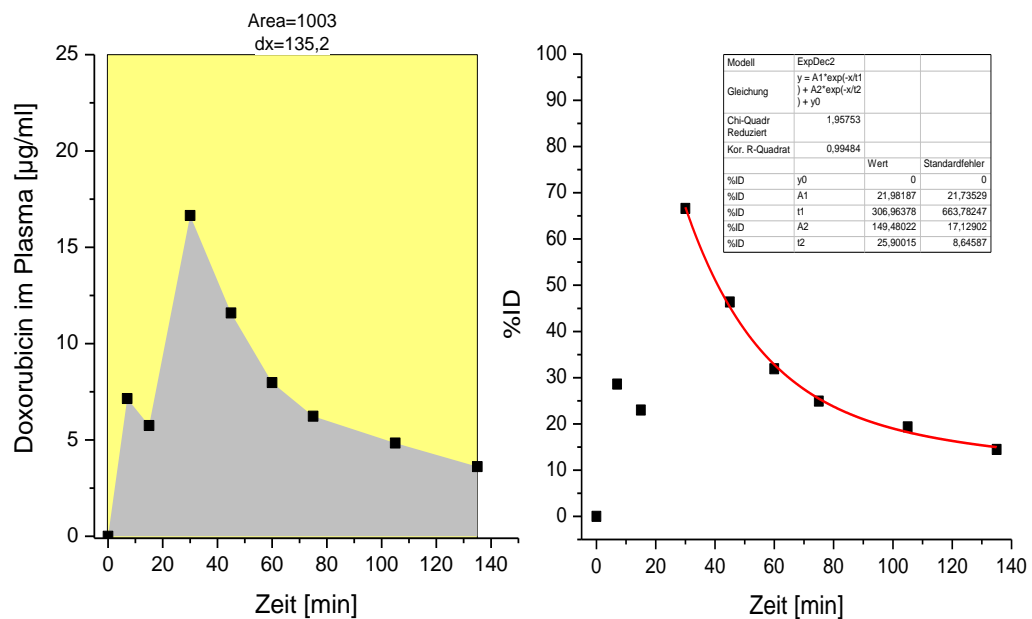


Abbildung 10: Pharmakokinetik des DPPG₂-TSL-DOX bei einer Katze mit simultaner RHT.

Innerhalb der ersten und dritten Therapiegruppe konnten starke Abweichungen der DOX-Konzentrationen im Plasma festgestellt werden. Diese Schwankungen waren in der zweiten Dosisgruppe auch vorhanden, jedoch nicht so ausgeprägt. Dies wird in den **Abbildungen 11, 12, 13 und 14** veranschaulicht. Aus diesen Abbildungen ist auch zu entnehmen, dass eine höhere Dosierung von DPPG₂-

TSL-DOX zu höheren DPPG₂-TSL-DOX-Konzentrationen in Plasma führt, die Halbwertszeit steigt und die AUC wird größer.

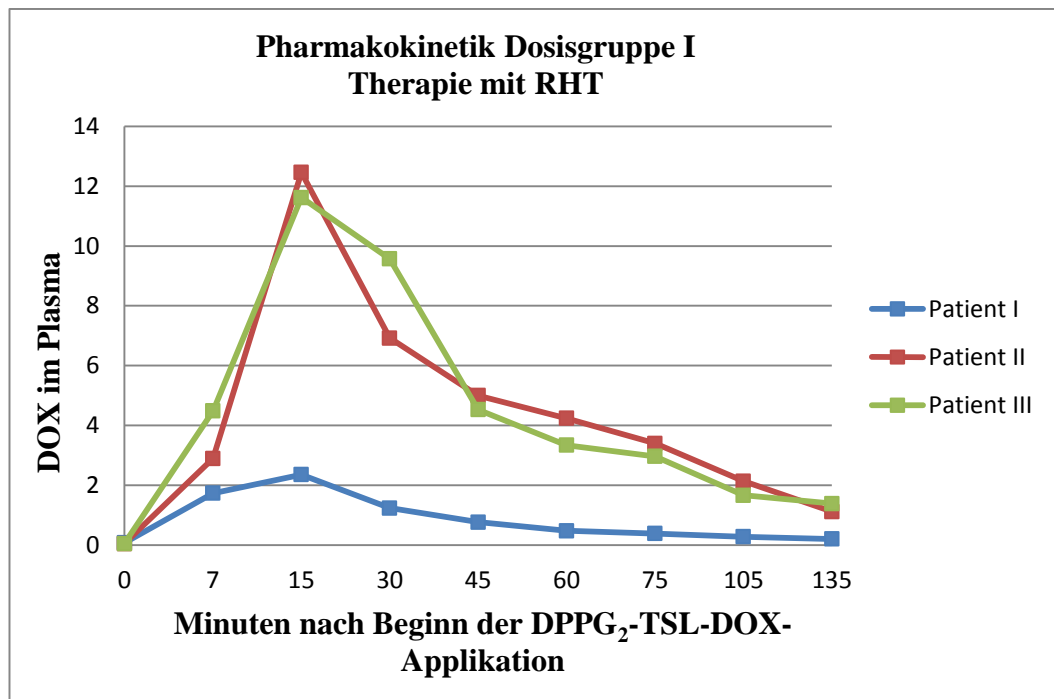


Abbildung 11: *Pharmakokinetik des DPPG₂-TSL-DOX unter Einfluss der RHT, Dosisgruppe I.*

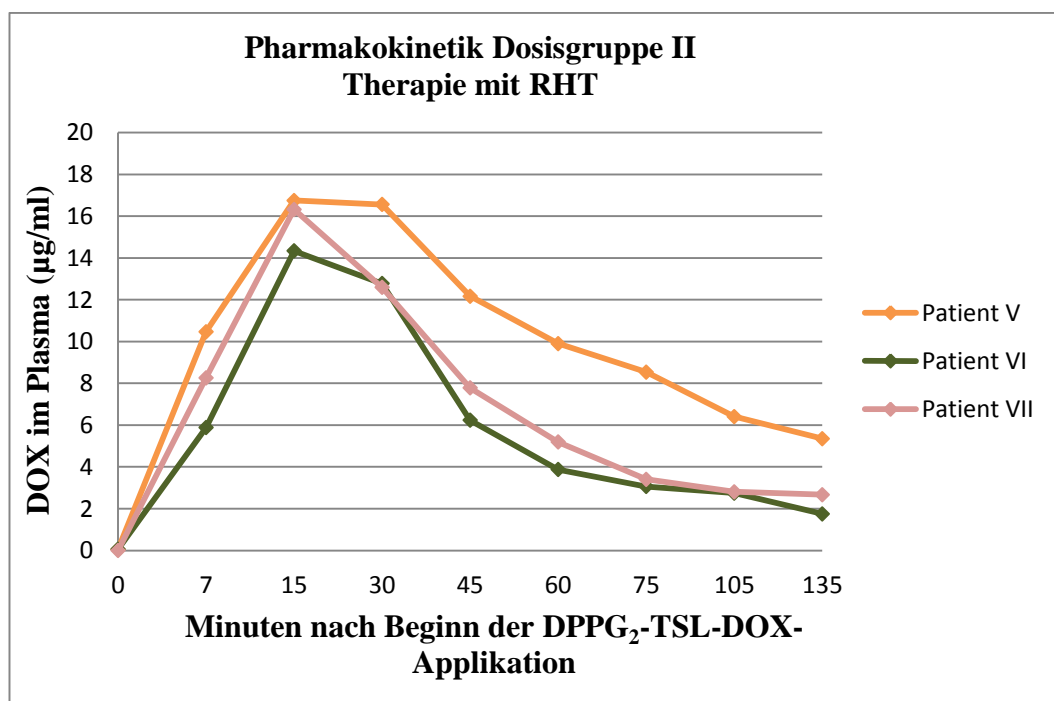


Abbildung 12: *Pharmakokinetik des DPPG₂-TSL-DOX unter Einfluss der RHT, Dosisgruppe II.*

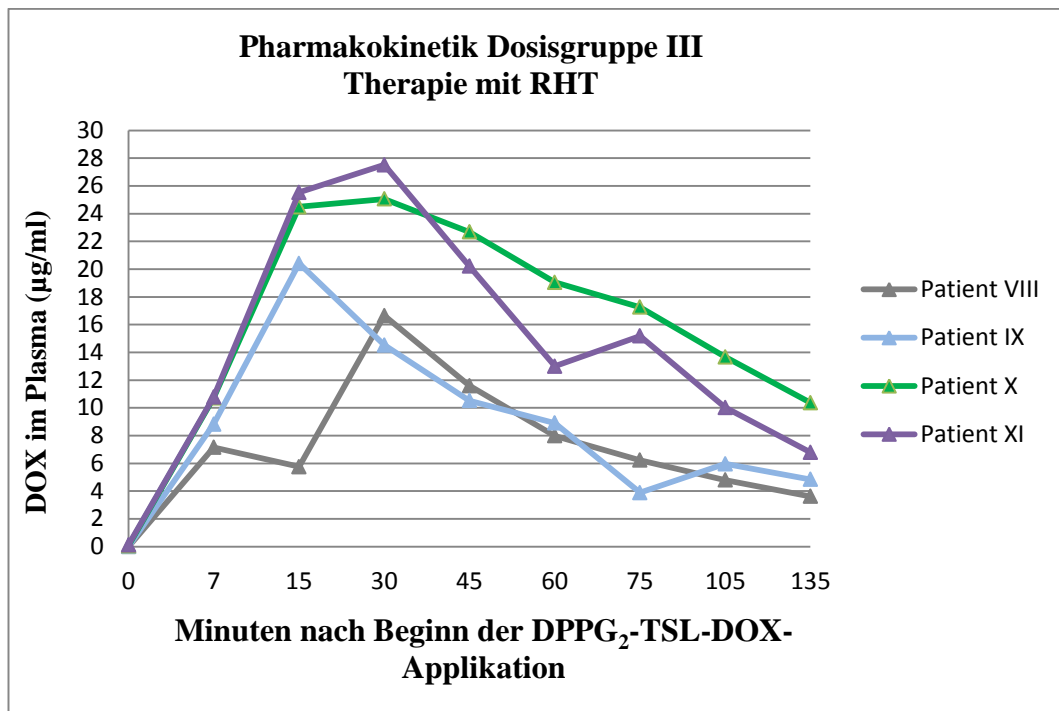


Abbildung 13: Pharmakokinetik des DPPG₂-TSL-DOX unter Einfluss der RHT, Dosisgruppe III.

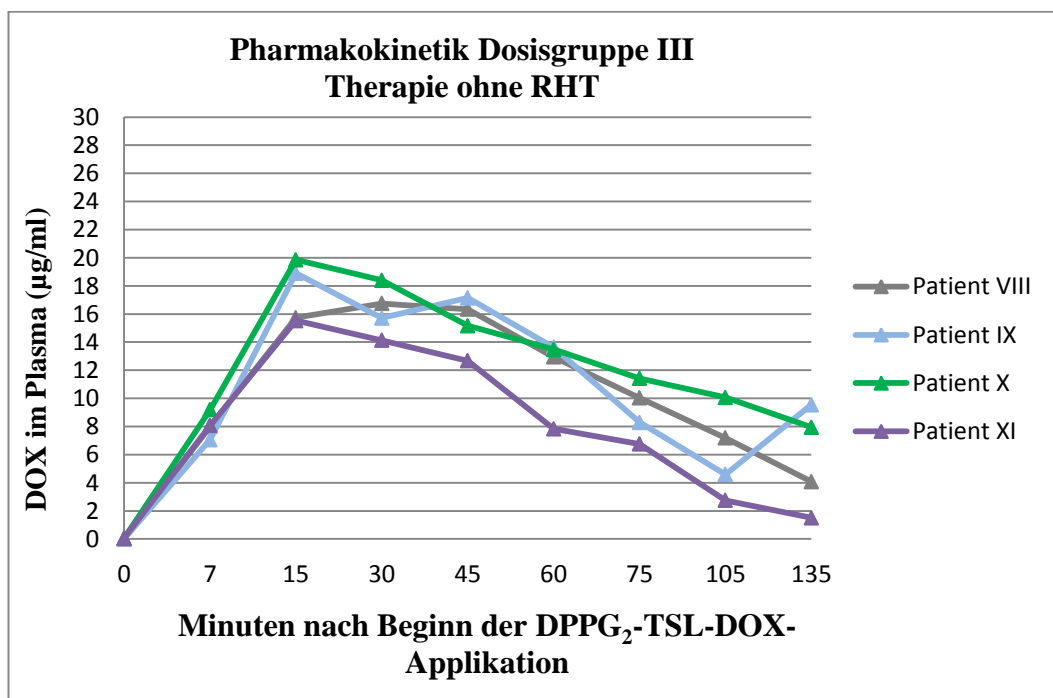


Abbildung 14: Pharmakokinetik des DPPG₂-TSL-DOX OHNE Einfluss der RHT, Dosisgruppe III.

5.2. Intratumorale DOX-Konzentration

Es konnte in keiner Dosisgruppe eine Aussage getroffen werden über den Zusammenhang zwischen der infundierten DPPG₂-TSL-DOX-Dosierung und der gemessenen Konzentration im Tumorgewebe, da die DOX-Konzentration in allen Auswertungen nur wenig über der Nachweisgrenze lag.

6. Toxizität

6.1. Systemische Toxizität⁵

Es wurde bei keinem Patienten, unabhängig von der Dosisgruppe, eine CARPA-Reaktion auf den infundierten DPPG₂-TSL-DOX beobachtet.

6.1.1. Dosisgruppe I

Patient # I wurde mit einer milden Anämie und Leukozyten im oberen Referenzbereich vorgestellt. Der Hämoglobinwert lag im unteren Referenzbereich. Die Anämie bestand weiter bei der abschließenden Studienuntersuchung. Bei diesem Patienten wurde zusätzlich im Laufe der Therapie eine Leukozytose mit einer Neutrophilie beobachtet. Niedrige Thrombozytenwerte wurde intermittierend bei Patient # II und III dokumentiert. Patient # I und # III zeigten infolge einer geringgradigen Hyporexie einen Gewichtsverlust (Grad I) von 5 bzw. 8% auf.

Patient # III zeigte in der Aufwachphase der Therapiesitzung E eine Schwellung am Kinn. Diese Schwellung bestand für weitere 15 Minuten, war aber danach nicht mehr festzustellen.

Das Allgemeinbefinden konnte bei allen Patienten als ungestört bezeichnet werden. Eine renale oder kardiale Toxizität wurde nicht beobachtet.

⁵ Labordaten, Anhang Kapitel 6, Seite 95

6.1.2. Dosisgruppe II

Alle Patienten (# V, VI und VII) entwickelten während der Therapie eine milde regenerative Anämie (# VI und VII Grad I), welche sich nach Abschluss des Therapieprotokolls wieder normalisierte. Die etwas stärkere regenerative Anämie (Grad II) des Patient # V ist auf die chronischen Einblutungen in den Tumor während der Therapie zurückzuführen. Dieser Patient zeigte einmalig eine niedrige neutrophile Granulozytenzahl.

Alle Patienten zeigten während des Therapiezeitraumes einen Gewichtsverlust infolge verminderter Futteraufnahme (# VI 1% (Grad I); # VII 9% (Grad I); # V 13% (Grad II)). Lediglich Patient # VII, welcher unter der Therapie einen Abszess entwickelte, zeigte bei der Kontrolluntersuchung Fieber und deswegen ein mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden. Dieses normalisierte sich direkt nach der operativen Versorgung. Patient # V zeigte bei Beginn der Therapie ein leicht bis geringgradig gestörtes Allgemeinbefinden, welches sich besserte, als die Tumoreinblutung weniger wurde.

Es gab in dieser Dosisgruppe keine Hinweise auf eine renale oder kardiale Toxizität.

6.1.3. Dosisgruppe III

Patient # XI wurde mit einer geringgradigen Anämie vorgestellt, welche sich während der Therapie besserte, aber noch bei der abschließenden Untersuchung bestand. Bei einer Nachkontrolle hatte sich dieser Wert jedoch wieder normalisiert. Bei den anderen Patienten (# VIII, IX und X) wurden intermittierende Hämatokrit-Werte im unteren Referenzbereich aufgezeichnet. Bei Patient # XI wurde zusätzlich eine milde intermittierende Thrombozytopenie festgestellt. Patient # IX zeigte einen Abfall der neutrophilen Granulozyten und der Gesamtleukozyten bei den Kontrolluntersuchungen. Diese Werte waren bis zur nächsten Therapie angestiegen, befanden sich jedoch im unteren Referenzbereich. Einmalig wurde eine Leukopenie mit normalem neutrophilen Granulozytenwert bei Patient # X festgestellt.

Patient # X entwickelte eine Grad I Azotämie, ab der vierten Therapiesitzung. Dieser Patient konnte trotzdem die folgenden Therapiezyklen durchlaufen, sowie

den Tumor exstirpiert bekommen. Zwei Patienten (# VIII und IX) zeigten aufgrund einer geringgradigen Hyporexie eine Gewichtsabnahme von 7% bzw. 5% (Grad I). Patient # X verlor 21% (Grad III) an Körpergewicht. Der Grund dafür lag an einer Hyporexie, wahrscheinlich durch die Azotämie bedingt.

Das Allgemeinbefinden der Patienten wurde als ungestört bewertet, bis auf Patient # X, welcher bei der letzten Untersuchung ein leicht gestörtes Allgemeinbefinden aufgrund von Tumorulzeration und Azotämie zeigte. Das Allgemeinbefinden besserte sich nach der Tumorexstirpation.

Grund für den Therapieabbruch von Patient # IX war eine persistierende Hypertension Grad II, ventrikuläre Extrasystolen, ein mittelgradig dilatiertes linkes Atrium, und eine konzentrische Hypertrophie des linken Ventrikels. Es bestand der Verdacht auf eine Myokarditis.

6.2. Lokale Toxizität

6.2.1. Dosisgruppe I

Lediglich ein Patient (# III) zeigte an einem Bereich des Tumors eine leichte Hautrötung und Ödembildung, welche 7 Tage nach der dritten Therapiesitzung auftrat. Im Verlauf der weiteren Therapie entstand in diesem Bereich eine oberflächliche Verbrennung (Grad I). Diese Veränderungen wurden als subakute Nebenwirkungen nach der QMHT-Klassifizierung eingestuft (BRUGGMOSER et al., 2012).

6.2.2. Dosisgruppe II

Patient # VII entwickelte nach der vierten Sitzung einen Abszess in Tumorbereich. Der Abszess führte zu einem vorzeitigen Ausstieg aus der Studie und eine operative Entfernung des Abszesses inklusive Tumor wurde durchgeführt.

Eine oberflächliche Verbrennung (Grad I) konnte bei der vorletzten Therapiesitzung bei Patient # V dokumentiert werden. Im Bereich der Verbrennung war bei den vorherigen Therapien die Temperatursonde platziert. Auch bei diesem Patient handelte es sich um eine subakute Nebenwirkung (BRUGGMOSER et al., 2012).

6.2.3. Dosisgruppe III

Patient # X wurde mit einer milden Hautrötung im Tumorbereich vorgestellt. Bei der Kontrolluntersuchung 7 Tage nach Therapiesitzung C fielen zwei Areale mit einer milden Verbrennung (Grad I) auf. Im Verlauf der Therapie kam es zur Ulzeration, einer dieser Bereiche wurde teilweise nekrotisch und eine geringgradige Sekretion bestand bei der Abschlussuntersuchung. Es handelte sich dabei um subakute Nebenwirkungen (BRUGGMOSER et al., 2012).

Bei den anderen Patienten (# VIII, IX und XI) bestand zu keinem Zeitpunkt Hinweise auf eine lokale Toxizität.

7. Re-Staging

7.1. Dosisgruppe I

Patient # III wies palpatorisch einen vergrößerten rechten Axillarlymphknoten auf. Durch eine zytologische Untersuchung konnte der Verdacht auf eine Sarkometastase geäußert werden. Die neue Umfangsvermehrung neben dem Primärtumor von Patient # II wurde nicht beprobt, nahm aber in der folgenden PET-MRT das Radiopharmakon auf. Damit könnte es sich um eine Satellitenmetastase handeln. Bei Patient # I war lediglich die schon bei Beginn der Therapie vorhandene, persistierende Anämie auffällig. In dieser Dosierungsgruppe gab es keinen Hinweis auf eine kardiale Toxizität.

7.2. Dosisgruppe II

In dieser Dosisgruppe waren die abschließenden Untersuchungen unauffällig, bis auf Patient #VII, der aufgrund des Abszesses ein mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden und Laborveränderungen in Sinne einer Entzündung aufwies. Eine Differenzierung zwischen tumorösem Gewebe und Abszess war nicht möglich. Anstatt einer abschließenden PET-MRT wurde eine MRT durchgeführt. Patient # V erlitt einen letalen Narkosezwischenfall während der abschließenden MRT, eine operative Exzision des Tumors war geplant. Bei keinem der Patienten

gab es Hinweise auf eine kardiale Toxizität oder eine Metastasierung des Tumors in der Lunge oder in abdominalen Organen.

7.3. Dosisgruppe III

Bei Patient # VIII und # XI wurden die Untersuchungen als unauffällig interpretiert. Patient # X wies, im Vergleich zur ultrasonographischen Untersuchung des Abdomens vor Beginn der Therapie, eine beidseitige Nephropathie und eine Masse am kranialen Pol der rechten Nebenniere auf. Diese Veränderung wurde nicht punktiert und kann als eine Metastase gewertet werden. Es gab bei diesem Patienten sonst keinen Hinweis auf eine Metastasierung in den abdominalen Organen oder in der Lunge. Im Labor war die bestehende Azotämie auffällig. Patient # IX wies die oben aufgeführten Veränderungen im Herzkreislaufsystem auf. Die Hypertension und die ventrikuläre Extrasystolen waren mit einer Dauermedikation von Atenolol 25-1A Pharma® 2,6 mg/kg (1A Pharma GmbH Oberhaching, Deutschland) und Amlodipin AAA® 0,5 mg/kg (AAA-Pharma GmbH, Stuttgart, Deutschland) gut zu behandeln.

8. Weitere Behandlungen nach Abschluss der Therapie

8.1. Dosisgruppe I

Patient # II unterlief einer chirurgischen Exzision des Tumors und der vermuteten Satellitenmetastase. Der Besitzer lehnte eine anschließende Strahlentherapie auf Grund des damit verbundenen Stresses für die Katze ab. Eine chirurgische Resektion war bei den anderen Patienten (# I und III) nicht möglich.

8.2. Dosisgruppe II

Für Patient #VI folgte nach Abschluss der Therapie eine chirurgische Exzision des Tumors und im Anschluss daran eine kurative Strahlentherapie (15 x 2,5 Gy). Nach der frühzeitigen Beendigung der Therapie wurde bei Patient # VII der Abszess inklusive Tumor chirurgisch exzidiert. Da keine tumorfreien Ränder erreicht werden konnten, folgte für den Patienten eine zweite Operation inklusive Teilresektion der letzten zwei Rippen, dieses Mal ohne vorherige Bildgebung. Als

der Patient zwei Wochen später zur palliativen Strahlentherapie vorstellig wurde, konnte zytologisch ein Rezidiv in Narbenbereich auf der linken Thoraxwand festgestellt werden. Auf der rechten Thoraxwand wurde bei der Untersuchung ebenfalls eine Umfangsvermehrung festgestellt, die histologische Untersuchung ergab die Diagnose Fibrosarkom. Das Rezidiv, mit Hyperthermie und DPPG₂-TSL-DOX vorbehandelt, wurde nach einem palliativen Protokoll (5 x 6 Gy) strahlentherapeutisch behandelt.

8.3. Dosisgruppe III

Bei allen Patienten konnte eine chirurgische Resektion des Tumors durchgeführt werden. Für Patient # VIII und # XI folgte eine kurative Strahlentherapie (15 x 2,5 Gy). Patient # IX wurde im Anschluss an die Operation nur palliativ (5 x 6 Gy) bestrahlt, obwohl tumorfreie Ränder erreicht werden konnten. Der Grund dafür lag an dem erhöhten Narkoserisiko, aufgrund der Herzveränderungen. Die Medikation bezüglich der ventrikulären Extrasystolen und der Hypertonie wurden weiterhin fortgeführt. Auf eine nachfolgende Strahlentherapie wurde bei Patient # X aufgrund der persistierenden Azotämie und dem daraus erhöhten Narkoserisiko verzichtet. Für diesen Patienten folgten eine intensive Infusionstherapie und eine symptomatische Therapie der Azotämie.

9. Follow Up

9.1. Dosisgruppe I

Patient # II war 1 Jahr nach Abschluss der Therapie und anschließender operativer Tumorexstirpation rezidivfrei. Patient # I wurde 2,5 Monaten nach der Therapie vom Haustierarzt euthanasiert. Der Grund dafür war ein schlechtes Allgemeinbefinden, welches nicht offensichtlich in Verbindung mit der Tumorerkrankung stand. Der Tumor von Patient # III zeigte auch nach Ende der Therapie ein progressives Wachstum und der Patient wurde 2 Monaten nach Beendigung der Therapie vom Haustierarzt euthanasiert. Zur diesem Zeitpunkt bestand auf Grund des Tumors Atemnot und der Tumor war ulzeriert.

9.2. Dosisgruppe II

Patient # VI war 1 Jahr nach der Therapie, anschließender operativer Exzision und kurativer Strahlentherapie rezidivfrei. Patient # VII wurde 3 Wochen nach der palliativen Strahlentherapie wieder vorstellig. Ein progressives Wachstum konnte für das bestrahlte Rezidiv sowie für den Tumor auf der gegenüberliegenden Seite festgestellt werden. Der Patient zeigte bis zum Zeitpunkt der Tumorulzeration, 7 Monaten nach der letzten Therapiesitzung, ein gutes Allgemeinbefinden. Eine Euthanasie erfolgte auf Grund der Tumorulzeration.

9.3. Dosisgruppe III

Ein Tumorrezidiv konnte bei keinem der Patienten festgestellt werden, 5 Monate (# VIII), 6 Monate (#IX) sowie 2 Monate (# XI) nach der an die Therapie anschließenden operativen Tumorentfernung und Strahlentherapie.

Patient # IX wurde ein halbes Jahr später einer Kontroll-Echokardiographie unterzogen. Diese Untersuchung ergab, dass der linke Vorhof kleiner geworden war und die Hypertrophie leicht rückgängig war. Die Medikation wurde weiterhin fortgeführt.

Die symptomatische Therapie für die Nierenerkrankung bei Patient # X führte zu keiner Besserung der Azotämie. Der Patient verstarb 1,5 Monate nach Therapieende und Operation. Bis dahin war der Patient rezidivfrei.

V. DISKUSSION

Durchführbarkeit und Praktikabilität

Die Kombinationstherapie DPPG₂-TSL-DOX simultan zur regionalen Hyperthermie beim feline Fibrosarkom lässt sich gut durchführen. Alle Tumoren waren gut zugänglich und eine akkurate Ankopplung des Applikators war gegeben. Eine unproblematische, schnelle Erwärmung der einzelnen Tumoren auf die Zieltemperatur wurde aufgezeichnet. Je kleiner der Tumor desto schneller verlief die Aufwärmphase. Die intratumoralen Temperaturdaten, die während der einzelnen Therapiesitzungen dokumentiert worden sind, deuten auf eine gute Qualität der Hyperthermieapplikation hin (OLESON et al., 1993; BRUGGMOSER et al., 2012). Die Temperaturverteilung innerhalb der Tumoren kann allerdings nicht akkurat beurteilt werden, da nur eine invasive intratumorale Temperatursonde eingesetzt wurde. In einigen Arealen, vorwiegend in der Peripherie, wurden dementsprechend keine Temperaturwerte aufgezeichnet.

Fibrosarkome weisen einen heterogenen Aufbau auf und die entlang des Stichkanals erhobenen Temperaturdaten sind nicht für den gesamten Tumor repräsentativ, vor allem nicht bei größerem Tumolvolumen. Die Temperaturverteilung könnte anhand von mehreren Temperatursonden besser detektiert werden. Da aber Fibrosarkome zur Ulzeration neigen, wurde von einer mehrmaligen Punktion während jeder Sitzung abgesehen. Eine noch bessere Detektion könnte anhand einer nicht invasiven Temperaturmessung mittels MRT durchgeführt werden, da durch diese Methode die präzise Temperaturverteilung im Gesamtvolumen des Tumors veranschaulicht werden kann. Die erreichten Temperaturen für T₉₀ lagen im Bereich von 41,4 bis 41,9 °C. Anhand von pharmakokinetischen in Vitro-Messungen kann eine maximale intratumorale Freisetzung des DOX aus dem DPPG₂-TSL angenommen werden. Dies spricht ebenfalls für eine gute Qualität der applizierten Hyperthermie, genauso wie die erreichten Temperaturen für T₅₀. Die unterschiedlichen Werte des CEM₄₃ lassen sich anhand der Zieltemperatur erklären. Mit steigender Zieltemperatur steigt auch CEM₄₃. Bei einzelnen Sitzungen in der ersten und zweiten Dosisgruppe wurde mit einer Zieltemperatur von 45 °C bei Tumoren mit großen Volumina gearbeitet, im Gegensatz zu der Standardzieltemperatur von 42 °C bei kleineren Tumoren.

Pharmakokinetik

Die maximale DOX-Konzentration im Plasma wurde bei allen Patienten zum Zeitpunkt 7 Minuten nach Beginn der Applikation dokumentiert. Dabei kann angenommen werden, dass die im Plasma gemessene DOX-Konzentration der des DPPG₂-TSL-DOX annähernd gleich ist. Aus den Liposomen freigesetztes DOX ist auch in den Messungen eingeschlossen, wobei freies DOX dabei aber nur einen verschwindend geringen Anteil ausmacht, da freies DOX rasch aus dem Plasma eliminiert wird (WANG et al., 2006). Ein Anstieg der DOX-Plasmakonzentration wurde von Dosisgruppe zu Dosisgruppe beobachtet. Die Zellen des RES können nur eine bestimmte Menge des DPPG₂-TSL-DOX aufnehmen (ALLEN, 2007). Eine Dosiserhöhung bewirkt, dass die Aufnahmekapazität schneller erreicht wird, die Zirkulationszeit sich verlängert und die Plasmakonzentration steigt. Auch die AUC wird größer. Mit einer Hyperthermiebehandlung verteilt sich das DOX nach der intravaskulären Freisetzung schneller ins Tumorgewebe, als bei einer alleinigen DPPG₂-TSL-DOX-Applikation. In den Graphen wird dies, im Vergleich zu einer Behandlung ohne Hyperthermie, durch den exponentiellen Abfall der t_{α} -Phase ersichtlich. Das Ende der Hyperthermie nach 60 Minuten wird in den Graphen durch die anschließende t_{β} -Phase mit einem fast linearen Abfall visualisiert. Diese Phase beschreibt ein eventuelles Leakage des DOX aus den DPPG₂-TSL, den DPPG₂-TSL-Abbau, sowie die Elimination des freigesetzten DOX, welches aus dem Gewebe wieder in das Blutplasma übertritt. Dieses Phänomen wurde bereits von Zimmermann beobachtet (ZIMMERMANN, 2014).

Innerhalb der Gruppen wurden auch unterschiedliche Konzentrationen von DOX im Plasma dokumentiert. Unterschiedliche Tumervolumina können dazu führen, dass eine homogene Erwärmung einzelner Tumore nicht möglich ist, dementsprechend könnte es in einzelnen Tumoren zu einer verminderten Freisetzung des DOX kommen. Die aufgezeichneten Temperaturdaten sprechen bei allen Patienten dagegen. Eine Vasokonstriktion, verursacht durch eine Hypotension, könnte während der Applikation zu einer verminderten Wirkstoffbereitstellung im Tumor führen.

Es konnte kein Zusammenhang zwischen der infundierten DPPG₂-TSL-DOX-Dosierung und der intratumoral gemessenen Konzentration des DOX gefunden

werden. Die maximale, intratumorale DOX-Konzentration wird 60 Minuten nach Beginn der Applikation erwartet, zu diesem Zeitpunkt wurden auch die Proben entnommen. Durch die Biopsien konnten nur kleine Mengen an Tumorgewebe gewonnen werden, welche den gesamten Tumor nicht widerspiegeln können. Die Tumoren weisen zudem einen recht heterogenen Aufbau auf, so dass auch von einer heterogenen Gewebsverteilung des DOX auszugehen ist. Die entnommenen Proben waren in Bezug auf die intratumorale DOX-Konzentration nicht für den Gesamttumor repräsentativ. Ein besserer Ansatz wäre es, den gesamten Tumor kurz nach der Applikation zu exzidieren und daraus die DOX-Konzentration zu bestimmen. Dieses Vorgehen wurde in Nagermodellen umgesetzt, wobei eine steigende DPPG₂-TSL-DOX-Dosis zu höheren intratumoralen DOX-Konzentrationen führte. In diesen Versuchen wurden aber deutlich höhere Dosen verwendet.

Tumoransprechen

Der einzige Patient, der eine Progression aufwies, zeigte auch das größte Tumolvolumen. Aufgrund der Größe passte nicht der gesamte Tumor unter den Applikator, so konnte keine homogene Erwärmung des Tumors stattfinden. Daraus folgte eine inhomogene Verteilung des DOX innerhalb des Tumors. Die Tumoranteile die außerhalb der Reichweite des Applikators und damit der Erwärmung gelegen waren, zeigten eher eine Progression. Eine Veränderung der Tumorbeschaffenheit konnte hingegen aufgezeichnet werden. Während der Therapie entstanden zystische Areale innerhalb des Tumors, die auch einmal punktiert werden konnten. Flüssige Areale innerhalb eines Tumors sprechen für eine Nekrose, welche durch die Therapie oder die Tumorprogression entstanden sein können. Bei diesem Patienten handelte es sich um ein Tumorrezidiv und diese sind bekannt für ihr aggressiveres Wachstum. Dieser Patient war auch der einzige, der während der Therapie eine Lymphknotenmetastase entwickelte. Zum Zeitpunkt der Abschlussuntersuchung konnten keine Fernmetastasen in der Lunge festgestellt werden. Mit zunehmender Tumorprogression zeigte der Patient Atemprobleme und zum Zeitpunkt der Euthanasie bestand der Verdacht auf ein intrathorakales Wachstum des Tumors.

Alle anderen Patienten sprachen auf die Therapie an, lediglich Patient # VI zeigte ein stabiles Krankheitsgeschehen. Alle anderen wiesen eine partielle Remission

auf, darunter auch die beiden Patienten (# VII, IX), welche die Therapie vorzeitig abgebrochen hatten. Der Tumor von Patient # VI wies schon zu Beginn der Therapie ein relativ kleines Volumen mit $8,2 \text{ cm}^3$ auf und war sehr fest mit der Wirbelsäule verwachsen. Während der Therapie veränderte sich vor allem die Konsistenz des Tumors. Es konnte keine bedeutende Volumenreduktion erreicht werden, jedoch war der Tumor durch die Therapie fast vollständig umgreifbar geworden und konnte im Anschluss an die Therapie erfolgreich operativ entfernt werden.

Die etwas geringere Volumenreduktion bei Patient # I lässt sich anhand des relativ großen Tumorumfanges ($59,6 \text{ cm}^3$) in Kombination mit der niedrigsten Dosis des DPPG₂-TSL-DOX erklären. Ein besseres Ansprechen wäre mit einer höheren Dosis denkbar.

Patient # II zeigte in der Dosisgruppe $0,6 \text{ mg/kg}$ DPPG₂-TSL-DOX das beste Ansprechen und wies gleichzeitig das geringste Volumen mit $22,2 \text{ cm}^3$ auf. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine deutlich homogenere Erwärmung und damit Verteilung des DOX bei diesem Patienten stattgefunden hat. Auffällig bei diesem Patienten war das Auftreten einer neuen Umfangsvermehrung in der Nähe des Primärtumors aber außerhalb des Hyperthermiefeldes nach zwei Therapiezyklen. Diese wurde nicht beprobt, zeigte aber in der PET-MRT eine Anreicherung des Radiopharmakons. Dieses Bild spricht wahrscheinlich für eine Satellitenmetastase, allerdings kann eine Entzündung nicht sicher ausgeschlossen werden. Die Entstehung eines zweiten Primärtumors innerhalb so kurzer Zeit wäre auch möglich. Während des Legens der Temperatursonde, sowie bei der Gewebsentnahmen könnte es zu einer Implantation von Tumorzellen entlang des Stichkanals gekommen sein. Die Umfangsvermehrung trat wenige Zentimeter vom Primärtumor auf, was sich aufgrund der beweglichen Katzenhaut erklären lässt. Um die Entstehung von Satellitenmetastasen zu verhindern ist es wichtig, dass die Haut bei der Implantation der Temperatursonde sowie bei den Gewebsentnahmen nicht über den Tumor geschoben wird, sondern über den Tumor gespannt wird. Außerdem ist es wichtig, einen Sondeneingang in unmittelbarer Nähe des Tumors zu wählen.

Die sehr schnell einsetzenden neurologischen Symptome nach den Aufnahmeuntersuchungen verhinderten die Therapie von Patient # IV. Anhand

der neurologischen Untersuchung konnten die Ursache der Paraplegie und der Überlaufblase in der Brustwirbelsäule im Interskapularbereich lokalisiert werden. Dies entsprach der Lokalisation des Tumors. Da es sich bereits um das 7. Rezidiv handelte, war von einem aggressiveren Tumorwachstum auszugehen, in der MRT konnte ein sehr infiltratives Wachstum aufgezeichnet werden und der Tumor wurde als Grund der neurologischen Ausfälle gesehen. Eine weitere mögliche Ursache wäre eine nicht vorsichtig genug vorgenommene Lagerung für die MRT in Narkose gewesen, wodurch das Rückenmark Schaden genommen haben könnte.

Patient # V (0,8 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX) zeigte zu Beginn der Therapie ein leicht gestörtes Allgemeinbefinden, welches auf die Tumoreinblutung zurückgeführt werden konnte. Die Therapie führte bei diesem Patient neben einer deutlichen Tumolvolumenreduktion auch dazu, dass die Blutung gestoppt werden konnte und das Allgemeinbefinden des Patienten sich verbesserte. Die Ursache des letalen Narkosezwischenfalles blieb unbekannt, alle Untersuchungen im Rahmen der Re-Staging waren als unauffällig zu beurteilen.

In der zweiten Therapiegruppe zeigte Patient # VI mit einer Tumolvolumenreduktion um 29,2% den geringsten Tumorrückgang. Bei diesem Patienten handelte es sich um ein Rezidiv. In der dritten Therapiegruppe (1,0 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX) sprach ebenfalls der Patient mit einem Rezidiv (# X) schlechter auf die Therapie an.

Das berechnete Tumolvolumen bei Patient # IX während der letzten Therapiesitzung beruht höchstwahrscheinlich auf einer fehlerhaften Messung. Anhand dieser Messungen wäre der Tumor progressiv, jedoch konnten bei der Abschlussuntersuchung deutlich kleinere Werte ermittelt werden. Das Ansprechen dieses Patienten wurde deswegen als eine partielle Remission interpretiert. Das Tumolvolumen bei den Abschlussuntersuchungen wurde bei allen Patienten für die Beurteilung des Gesamtansprechens herangezogen, auch wenn die Messungen im wachen Zustand stattgefunden hatten. Ein Rückgang nach der letzten Therapiesitzung wurde damit in der Gesamtbeurteilung berücksichtigt.

Durch die Tumolvolumenreduktion wurden einige Tumoren (# VII, VIII) sehr flächig und die Pseudokapsel ging verloren. Die Abgrenzung zwischen gesundem

Gewebe und Tumor gestaltete sich mit zunehmender Remission schwieriger. Deswegen könnten die mittels Schieblehre dokumentierten Messwerte größere Ungenauigkeiten aufweisen, im Gegensatz zu Messungen bei anderen Tumoren mit einer deutlichen Abgrenzung zum umliegenden Gewebe. Eine genauere Messung, sowie die Beschreibung der Tumorausdehnung in die Tiefe, könnte anhand von den PET-MRT-Daten oder einer anderen Bildgebung erhoben werden. Auch die Implantation der Temperatursonde gestaltete sich aufgrund der erschwerten Abgrenzung zwischen gesundem und tumorösem Gewebe als schwierig. Bei solchen Tumoren könnte die Gefahr von lokalen Nebenwirkungen erhöht sein. Es muss in Betracht gezogen werden, ob diese Tumoren frühzeitig chirurgisch entfernt werden sollten, um das Risiko lokaler Nebenwirkungen zu senken.

Das Tumoransprechen stieg mit den Dosisgruppen. Allerdings wurden Patienten mit einem geringeren Tumolvolumen in der Dosisgruppe III als in Dosisgruppe I therapiert. Durch ein kleineres Volumen passte der gesamte Tumor unter den Applikator und eine homogenere Erwärmung wurde damit eher erreicht. Bei vielen Tumoren wurde nicht nur eine Volumenreduktion aufgezeichnet, sondern auch der Palpationsbefund veränderte sich im Laufe der Therapie. Häufig wurden die Tumoren besser umgreifbar und weicher.

Die größte Volumenreduktion konnte bei vielen Patienten nach den ersten drei bis vier Sitzungen beobachtet werden. Wenn diese Tumorveränderung eine operative Entfernung schon erleichtern würde, könnte diskutiert werden, ob eine frühere Operation stattfinden sollte. Dadurch könnte den Patienten einige Narkosen erspart werden, außerdem wäre die Gefahr, die kumulative DOX-Dosis erreicht zu haben, nicht gegeben. Die Messungen wurden nur mittels einer Schieblehre durchgeführt, jedoch wurde von einer höheren Messungsgenauigkeit ausgegangen, da die Messungen in Narkose durchgeführt wurden. Im wachen Zustand trägt die Kooperationsbereitschaft der Katze zu der Messgenauigkeit bei, außerdem kann die Körperspannung die Messungen bei einigen Tumoren zusätzlich erschweren.

Die Kombinationstherapie ermöglichte oder erleichterte die chirurgische Exzision von sieben Tumoren.

Systemische Toxizität

Die DPPG₂-TSL-DOX-Applikation wurde gut vertragen und konnte ohne eine Prämedikation mit Antihistaminika oder Kortikosteroiden erfolgen. Die Therapie mit DPPG₂-TSL-DOX führte zu deutlich geringeren systemischen Nebenwirkungen, verglichen zu einer Standardtherapie mit DOX.

In allen Therapiegruppen wurde ein Gewichtsverlust beobachtet. Dieser war in sechs Fällen (# I, III, VI-IX) milde und beruhte auf einem verminderten Appetit. Die vielen Therapiesitzungen über einen relativ kurzen Zeitraum stellten für die Katzen sicherlich eine Stress-situation dar, welche sich in einer verminderten Futteraufnahme widerspiegelte. Patient I und III waren für die Therapie zusätzlich in der Klinik untergebracht, was auch zu einer verminderten Futteraufnahme beigetragen haben könnte. Aufgrund einer Einblutung in den Tumor zeigte Patient # V anfangs ein leicht gestörtes Allgemeinbefinden, was in Kombination mit dem damit verbundenen Stress zu einer verminderten Futteraufnahme führte. Daraus kann der etwas stärkere Gewichtsverlust (Grad II) erklärt werden. Bei Patient # IX lässt sich der größere Gewichtsabfall (Grad III) durch die während der Behandlung entstandene Azotämie erklären.

Die intermittierende niedrige Thrombozytenzahl bei Patient # II, III und XI könnte auf einem Messfehler beruhen, da dieses Phänomen nicht regelmäßig in den entsprechenden Dosisgruppen auftrat. Katzenblut neigt sehr schnell zur Verklumpung. Eine paraneoplastische Thrombozytopenie kann auch in Betracht gezogen werden, diese würde aber über einen längeren Zeitraum bestehen und korreliert außerdem häufig mit einer Tumorprogression, welche hier aber nicht beobachtet wurde. Patient # III zeigte zwar eine Tumorprogression, aber es wurde in diesem Zeitraum nur einmalig ein niedriger Thrombozytenwert dokumentiert. Die bei den Patienten beobachteten Leukozytosen, die entweder alleine, oder in Kombination mit einer Neutrophilie ohne Linksverschiebung auftraten, konnten auf Stress und Aufregung der Patienten zurückgeführt werden. Wegen der während der Therapie entstandenen Neutrophilie mit Linksverschiebung wurde der Patient # I erfolgreich mit Synulox 12,5 mg/kg (Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) zweimal täglich therapiert. Es bestand kein Verdacht auf einen Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Entzündungszellzahlen und der Therapie. Der Tumor war zu diesem Zeitpunkt reizlos. Aufgrund des Abszesses

konnte bei Patient # VII ebenfalls eine Neutrophilie mit Linksverschiebung dokumentiert werden.

Ein Neutropenie wurde während der Studie in keiner Dosisgruppe dokumentiert. Dies spricht dafür, dass das DOX lokal im Tumor freigesetzt worden ist. Patient # IX zeigte jedoch ein Abfall der neutrophilen Granulozyten sowie der Gesamtleukozyten bei den Kontrollen sieben Tage nach der Therapie. Der Abfall der Zellen war nie so stark, dass der Patient sepsisgefährdet war und eine prophylaktische Antibiotikagabe war ebenfalls nicht indiziert. Der Tumor befand sich auf Höhe des Herzens auf der rechten Thoraxwand. Eine Freisetzung des DOX im Herzen und damit im Blutkreislauf durch eine zu tiefe Erwärmung, kann nicht ausgeschlossen werden. Die Neutrophilenzahl waren bis zur nächsten Therapiesitzung angestiegen und ein Therapieaufschub musste nicht stattfinden.

Die ab der vierten Therapiesitzung entstandene Azotämie des Patienten # X könnte mehrere Ursachen haben. Ältere Katzen haben nicht selten eine chronische Nierenerkrankung (CNE), welche in einem sehr späten Stadium erst anhand von Laborwerten detektiert werden kann. Es wäre möglich, dass eine Schädigung vor Beginn der Therapie vorlag, welche weder ultrasonographisch noch im Labor ersichtlich war und sich drastisch durch die vielen und langen Narkosen verschlechterte (sogenanntes „akut auf chronisch“). Eine Minderdurchblutung der Nieren während der Narkosen kann trotz Blutdruckmessungen nicht ausgeschlossen werden, dies könnte zu einer Progression der Azotämie beigetragen haben. Der Tumor war rechts dorsal im Bereich der letzten Rippen lokalisiert. Als weitere Ursache für die Azotämie käme deshalb auch eine Miterwärmung der rechten Niere in Frage. Bei der Abschlussuntersuchung wiesen beide Nieren chronische Veränderungen auf, deshalb scheint diese Ursache wenig plausibel. Durch eine eventuelle Erwärmung der rechten Niere wäre auch eine Freisetzung des DOX innerhalb derselben möglich. Eine schlagartige Freisetzung von hochkonzentriertem DOX könnte die Niere akut schädigen und würde zu einer größeren Menge an DOX im systemischen Kreislauf führen, sowie eventuell auch zu einer Myelosuppression im Sinne einer klassischen Chemotherapie. Eine vermehrte systemische Toxizität wurde bei diesem Patienten in keiner Therapiesitzung beobachtet. Die kumulative Dosis für eine Niereninsuffizienz, verursacht durch eine DOX-Therapie, wurde nicht überschritten. Am

wahrscheinlichsten scheint eine subklinische Vorschädigung der Nieren, die sich in Kombination mit den oben genannten Faktoren verschlechtert hat. Die Umfangsvermehrung der rechten Nebenniere, die während der Ultraschalluntersuchung im Rahmen der Abschlussuntersuchung sichtbar wurde, könnte eine Metastase des Fibrosarkoms sein. Eine andere Neoplasie oder eine Zyste wäre auch denkbar. Es besteht die Möglichkeit, dass diese Veränderung schon vor Beginn der Therapie vorlag, aber nicht ultrasonographisch dargestellt werden konnte.

Ein Abfall der Hämatokrit- und Hämoglobinwerte wurde bei mehreren Patienten beobachtet. Diese kamen sowohl als milde regenerative, als auch als mikrozytäre aregenerative Anämien vor (Grad I-III). Dieser Abfall fand bei den meisten Patienten kontinuierlich während der Therapie statt. Ein größerer Abfall konnte allerdings bei einigen Patienten bereits nach der ersten PET-MRT-Narkose im Rahmen der Voruntersuchungen dokumentiert werden, damit steht dieser Abfall nicht in Verbindung mit der Therapie. Bei diesen Narkosen wurde das Anästhetikum Propofol für die Einleitung benutzt, welches bekanntermaßen zu einer Heinz-Body-Anämie führen kann. Während der Therapiesitzungen wurden deswegen das Anästhetikum Alfaxolon für die Narkoseeinleitung verwendet. Allerdings wurde keine Brillantkresylblau- oder Methylenblaufärbung nach Alfaxolongabe durchgeführt, um eine Heinz-Body-Anämie auszuschließen. Der myelosuppressive Effekt des DOX auf die Erythrozyten wird gewöhnlich nicht nach so einer kurzen Zeit erwartet, da die Lebensdauer der Erythrozyten circa 90 Tage beträgt. Eine iatrogene Senkung des Hämatokrits sowie der Hämoglobinkonzentration durch mehrmalige Blutentnahmen im Rahmen der pharmakokinetischen Messungen muss in Betracht gezogen werden. Die Patienten erhielten während der Therapie regelmäßig Infusionen, die Blutproben für die Kontrolluntersuchungen wurden jedoch vor Beginn der Infusion entnommen. Damit kann ein verdünnender Effekt der Infusionen auf das Blutvolumen zum Zeitpunkt der Probenentnahme ausgeschlossen werden. Anzeichen einer Hämolyse oder Blutung bestand bei keinem der Patienten, abgesehen von Patient # V. Dieser Patient wies zu Beginn der Therapie eine Einblutung im Tumor auf. Die Einblutung könnte zur Anämie beigetragen haben, allerdings unterschied sich der Abfall des Hämatokrit nicht wesentlich von den anderen Patienten. Bei allen Patienten könnte auch eine andere Komponente wie z.B. ein Eisenmangel

aufgrund der chronischen Erkrankung zum Abfall beigetragen haben. Eine mögliche Beteiligung der CNE am Hämatokritabfall muss bei Patient # X in Betracht gezogen werden. Keiner der Patienten entwickelte aufgrund der Anämie klinische Symptome. Bei einer Kontrolle nach Ende der Therapie lag der Hämatokritwert bei Patient # VI, VII, VIII, IX und XI wieder im Referenzbereich. Die Anämie verschlimmerte sich bei Patient # X im Laufe der CNE. Der Hämatokrit wurde bei den restlichen Patienten durch den Haustierarzt nicht nachkontrolliert.

Die am Herzen auftretende Veränderungen bei Patient # IX könnte auf eine Erwärmung des Herzens beruhen. Der Tumor war ventral an der rechten Thoraxwand kaudal des Ellbogens lokalisiert. Für eine akkurate Ankopplung des Applikators musste die Haut gestrafft werden und dadurch befand sich der Tumor auf Höhe des Herzens. Weiterhin wies der Tumor nur ein geringes Volumen mit $4,1 \text{ cm}^3$ auf, was die Ankopplung zusätzlich erschwerte und es könnte auch zu wenig Bolus verwendet worden sein. Aufgrund eines technischen Problems wurde bei einer Sitzung der Tumor deutlich länger erwärmt, bevor DPPG₂-TSL-DOX appliziert wurde. Wenn bei dieser Sitzung zu wenig Bolus verwendet wurde, könnte das Herz über einen längeren Zeitraum erwärmt und dadurch geschädigt worden sein. Eine intrakardiale DOX-Freisetzung kann ebenfalls zu Schädigungen geführt haben, genauso wie das Zusammenspiel dieser beiden Komponenten. Während der nachfolgenden Therapiesitzung zeigten dieser Patient ventrikuläre Extrasystolen. Diese stellten den Grund für einen frühzeitigen Herzultraschall dar, in welchem die oben aufgeführten Veränderungen festgestellt wurden. Die Veränderungen konnten mit einer Myokarditis vereinbart werden. Differentialdiagnostisch kamen eine infiltrative Veränderung des Herzmuskels, oder eine hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) in Frage. Diese Ursachen erschienen weniger plausibel, da während des Herzschalls im Rahmen der Aufnahmeuntersuchungen kein Verdacht auf diese potentiellen Ursachen bestand. Die zum Zeitpunkt des Abbruchs bestehende Hypertonie könnte auch als Ursache der Veränderungen angesehen werden. Die Hypertonie entwickelte sich aber während der Therapie und könnte auch von den Veränderungen am Herzen hervorgerufen worden sein. Dies trifft ebenfalls auf die ventrikulären Extrasystolen zu. Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung einer HCM wäre eine Nierenerkrankung oder eine Hyperthyreose, welche aber beide bereits durch

die Aufnahmeuntersuchungen ausgeschlossen worden waren. Die Veränderungen waren ein halbes Jahr nach dem Therapieabbruch leicht rückgängig und der Patient mit der verordneten Medikation gut eingestellt. Dieser erhobene Befund wäre mit einer Myokarditis zu vereinbaren. Der Patient wies während des gesamten Zeitraums keine klinischen Symptome auf.

Lokale Toxizität

Die lokale Toxizität war in allen Dosisgruppen akzeptabel. Eine Progression der wenigen aufgezeichneten Verbrennungen wurde vor allem durch das Schlecken begünstigt. Die bei Patient # X entstandene Ulzeration und Nekrose war auf eine Automutilation zurückzuführen. Das Schlecken konnte mittels Halskragen oder Body nicht verhindert werden. Patient # III zeigte eine starke Tumorprogression, welche die lokale Veränderungen verstärkt haben könnte. Durch die Progression steigt die Hautspannung, die Elastizität lässt nach und die Haut wird dünner. Auch bei diesem Patienten kann das Schlecken nicht ausgeschlossen werden. Dies gilt ebenfalls für Patient # V. Es schien, als würde eine therapiebedingte Veränderung an der Tumoroberfläche das Schlecken begünstigen.

Der Tumor von Patient # VII war vor der Abszessentstehung sehr klein und flächig geworden, was eine Differenzierung von Tumor und umliegendem Gewebe erschwerte. Eine mögliche Ursache für die Abszessentstehung wäre ein nicht steriles, unsauberes Arbeiten während der Implantation der intratumoralen Temperatursonde, sowie bei der Entnahme der Biopsien. Eine andere Möglichkeit wäre ein Eindringen von Bakterien in den Tumor nach der vorherigen Sitzung, da der Sondeneingang nicht mittels eines Hauthefts verschlossen worden war. Dies scheint eher unwahrscheinlich, da die gesetzte Läsion durch die Implantation sehr klein war und sich normalerweise von alleine innerhalb kürzester Zeit schließt. Es wurde während der Studie mehrmals problemlos auf ein Verschließen des Sondeneingangs verzichtet. Eine Kontamination der DPPP₂-TSL-DOX-Charge käme auch als Ursache in Frage, die Kontamination könnte während der Herstellung oder der Zubereitung entstanden sein. Jedoch wäre eine bei der Herstellung entstandene Kontamination bei den Qualitätsanalysen aufgefallen. Eine Kontamination während der Zubereitung kann nicht ausgeschlossen werden, hätte aber weniger eine lokale Infektion verursacht, sondern eher die Anzeichen einer Sepsis hervorgerufen. Ein nicht steriles Arbeiten scheint als Ursache

plausibler. Eine Vorschädigung des Gewebes durch die mehrmalige Punktion des Tumors während der vorhergegangenen Sitzungen könnte die Entstehung eines Abszesses begünstigt haben. Das auf der anderen Körperhälfte kurz nach der ersten Operation entstandene Fibrosarkom könnte auf einer subkutanen Injektion von Schmerzmittel oder Antibiotika nach der Operation beruhen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Implantation von Tumorzellen entlang des Schnittrandes bei der chirurgischen Entfernung, weil nicht zwischen Abszess und Tumor unterschieden werden konnte. Der Schnittrand reichte bis zur Wirbelsäule und das neu entstandene-Fibrosarkom trat weit dorsal auf der andere Körperhälfte auf.

Maximum tolerated dose

In der ersten Dosisgruppe wurde die Therapie gut vertragen und die Dosis konnte gesteigert werden, da nur ein Patient lokale Nebenwirkungen aufwies. Ein besseres Ansprechen auf die Therapie bei einem ähnlich akzeptablen Nebenwirkungsspektrum konnte durch die Dosiserhöhung aufgezeichnet werden. Ähnliche lokale Nebenwirkungen wurden bereits von Zimmermann bei der Verabreichung von niedriger dosiertem DPPG₂-TSL-DOX beobachtet (ZIMMERMANN, 2014). Es wurde davon ausgegangen, dass die maximal tolerierte Dosis noch nicht erreicht worden war, woraufhin die Dosis auf 1,0 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX erhöht wurde. Diese Dosis entspricht der Standarddosis von freiem DOX. Mit dieser Dosierung wurden die ersten systemischen Nebenwirkungen in Form einer Azotämie (# X), erniedrigter Anzahl der neutrophilen Granulozyten (# IX) und Veränderungen am Herzen mit einer begleitenden Hypertension beobachtet. Patient # IX wies ein gutes Allgemeinbefinden auf und eine antibiotische Therapie aufgrund der niedrigen Neutrophilenzahlen war zu keiner Zeit indiziert. Die Veränderungen am Herzen lassen sich anhand der Durchführung der Hyperthermie erklären. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine akzeptable lokale Toxizität, die sich zwischen den Dosisgruppen nicht wesentlich veränderte, und eine ebenfalls akzeptable geringe systemische Toxizität dokumentiert werden konnten. Die Entstehung einer durch die Applikation des DOX bedingten CNE zu einem späteren Zeitpunkt muss allerdings in Betracht gezogen werden. In dieser Studie wurden keine Langzeitkontrollen der Patienten durchgeführt.

Es ist nachgewiesen worden, dass die zu erwartende MTD bei liposomal eingeschlossenen Medikamenten im selben Bereich wie bei freien Medikamenten liegt, wenn eine schnelle Freisetzung aus den Liposomen gegeben ist (ALLEN, 2007). Damit läge die zu erwartende MTD von DPPG₂-TSL-DOX bei 1,0 mg/kg. In einer Studie von Hauck et al. wurde LTSL-DOX in Kombination mit Hyperthermie bei Hunden mit unterschiedlichen Tumorgenese eingesetzt. Hier lag die MTD mit 0,93 mg/kg knapp unter dem von freiem DOX (HAUCK et al., 2006). Die maximal tolerierte Dosis wurde in der vorliegenden Studie aber nicht erreicht.

Limitationen

Eine Limitation der Studie stellte das nicht für alle Dosisgruppen einheitliche Therapieprotokoll dar. Hier anzusprechen ist das Therapieprotokoll von Patient # IV und V in der zweiten Therapiegruppe. Eine PET-MRT konnte aus organisatorischen Gründen bei diesem Patienten nicht durchgeführt werden. Außerdem musste auf ein Kontroll-MRT nach Hälfte der Therapiesitzungen verzichtet werden. In der ersten und zweiten Therapiegruppe wurde das DPPG₂-TSL-DOX sofort bei der ersten Sitzung in Kombination mit Hyperthermie verabreicht, in der dritten Dosisgruppe wurde eine zusätzliche Sitzung ohne Hyperthermie für die Pharmakokinetik eingeplant. Die PET-MRT-Kontrolle erfolgte aber in allen Gruppen nach zwei Sitzungen mit der Kombinationstherapie. Da das DPPG₂-TSL-DOX keinen ausgeprägten Tumortropismus aufweist, wurden keine erheblichen Veränderungen am Tumor durch die einmalige alleinige Applikation erwartet. Die Zieltemperatur unterschied sich ebenfalls bei einigen Sitzungen und Patienten in der ersten und zweiten Dosisgruppe von den geplanten 42 °C. Es wurde bei Tumoren mit einem größeren Volumen höhere Temperaturen gewählt, um eine homogenere Erwärmung, vor allem im Randbereich, zu erzielen. In der zweiten Dosisgruppe vervollständigten, im Gegensatz zu den anderen Gruppen, nur zwei Patienten die gesamte Therapie.

Es wurden Katzen mit unterschiedlich großen Tumoren in die Studie aufgenommen. Wie zuvor dargelegt, kann eine homogene Tumorerwärmung nicht stattfinden, wenn nicht der gesamte Tumor unter den Applikator passt. Durch die Tumorprogression von Patient # III und aufgrund der Daten von Zimmermann

wurde beschlossen, dass nur noch Katzen in die Studie aufgenommen werden sollen, deren Tumor unter den Applikator passt (ZIMMERMANN, 2014). Es ist nicht auszuschließen, dass in der ersten Dosisgruppe ein besseres Therapieansprechen hätte aufgezeichnet werden können, wenn die Tumoren kleiner gewesen wären. Ebenfalls wäre ein schlechteres Ansprechen in der dritte Dosisgruppe denkbar, hätten die Tumore ein größeres Volumen aufgewiesen. Der Applikator konnte nicht an die Tumorgroße angepasst werden, da nur eine Größe zur Verfügung stand. Es wurden sowohl Primärtumoren, als auch Rezidive therapiert. Rezidive sind für ein aggressiveres Verhalten bekannt und sprachen in dieser Studie erwartungsgemäß schlechter auf die Therapie an (# III, VI).

Eine weitere bedeutende Limitation der Studie ist die Beurteilung des Ansprechens nur anhand von Messungen mit einer Schieblehre. Wird der gleiche Tumor von mehreren Personen ausgemessen, werden verschiedene Werte erhoben. In dieser Studie wurden die Messungen der Tumoren nur in Ausnahmefällen nicht von derselben Person durchgeführt, um die individuelle Varianz klein zu halten. Die Beurteilung des Volumens und letztendlich des Tumorsprechens wäre durch eine PET-MRT exakter und reproduzierbarer. Dies wäre vor allem bei den flächig gewordenen Tumoren von Vorteil gewesen. Es ist bekannt, dass eine manuelle Messung zu deutlich geringeren Volumenergebnissen führt, als wenn die Messung anhand einer Bildgebung durchgeführt wird. Mittels einer PET-MRT könnten auch Veränderungen an den nekrotischen Anteilen des Tumors beurteilt werden. Diese Veränderungen gelten in der Humanmedizin als aussagekräftige Parameter bezüglich des Tumor-Ansprechens auf die Therapie (BAUR et al., 2003).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die einfache Durchführung und Umsetzung der Kombinationstherapie bestehend aus der intravenösen Applikation des DPPG₂-TSL-DOX simultan zu RHT beim feline Fibrosarkom wurde bestätigt. Durch die oberflächliche Lokalisation der Tumoren konnten diese ohne Probleme auf die Zieltemperatur erwärmt werden.

Die Pharmakokinetik des DPPG₂-TSL-DOX im Plasma wurde unter dem Einfluss der Hyperthermie in allen Dosisgruppen gemessen. Innerhalb der einzelnen Dosisgruppen konnten starke Abweichungen der gemessenen Plasmakonzentration der einzelnen Patienten aufgezeichnet werden. Eine Dosiserhöhung des DPPG₂-TSL-DOX führte zu einer Erhöhung der Plasmakonzentration bei allen Patienten innerhalb der Dosisgruppen. Auch die AUC stieg mit steigender Dosis. Dieses Phänomen lässt sich anhand der begrenzten Aufnahmekapazität der Zellen des RES erklären. Eine Überschreitung der Aufnahmekapazität führt zu einer höheren Plasmakonzentration. In der dritten Dosisgruppe, die 1 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX erhielt, wurde zusätzlich die Pharmakokinetik der Liposomen ohne Einfluss der Hyperthermie ermittelt. Der Einfluss der Hyperthermie auf der Freisetzung des DOX aus dem DPPG₂-TSL kann graphisch dargestellt werden. Bei einer alleinigen Applikation des DPPG₂-TSL-DOX konnte ein log-linearer Abfall der Plasmakonzentration des DOX dokumentiert werden. Eine simultane RHT führte hingegen zu einer raschen Freisetzung des Wirkstoffes aus den DPPG₂-TSL welche durch einen exponentiellen Abfall der Plasmakonzentration des DOX charakterisiert wird.

Eine Aussage über den Zusammenhang zwischen den applizierten DPPG₂-TSL-DOX und der gemessenen DOX-Konzentration im Gewebe konnte nicht getroffen werden da die Gewebekonzentrationen unterhalb der im Labor etablierten Nachweisgrenze lagen. Anhand der Biopsie wurden nur kleine Proben entnommen, welche nicht den Gesamttumor repräsentieren können.

Acht von insgesamt elf Studienpatienten vervollständigten die vorgesehenen Therapiesitzungen. Ein Patient wurde nach den Aufnahmeuntersuchungen aufgrund von tumorbedingten, neurologischen Symptomen aus der Studie ausgeschlossen. Grund des Abbruchs der anderen zwei Patienten waren zum einen die Abszessentstehung im Tumorbereich (# VII, Dosisgruppe 0,8 mg/kg DPPG₂-

TSL-DOX) zum anderen Veränderungen des Herzens (# IX, Dosisgruppe 1,0 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX). Eine chirurgische Tumorexzision war jedoch auch bei diesen Patienten möglich. Insgesamt wurde nur bei einem Patienten (# III, Dosisgruppe 0,6 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX) eine Progression des Tumors dokumentiert. Bis auf ein stabiles Krankheitsgeschehen (# VII, Dosisgruppe II) konnte bei den restlichen acht Patienten eine partielle Remission des Tumors durch die Therapie erreicht werden. Hierzu zählen auch die zwei Patienten, welche die Therapie vorzeitig abbrechen mussten. Die Ansprechrates stieg mit zunehmender Dosissteigerung. Von den acht Patienten die die gesamte Therapie vervollständigt haben, konnte im Anschluss der Tumor bei fünf Patienten reseziert werden. Davon wurden je ein Patient mit 0,6 mg/kg bzw. 0,8 mg/kg, und drei Patienten mit 1,0 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX therapiert.

Die Therapie wurde insgesamt gut toleriert. Die Applikation des DPPG₂-TSL-DOX konnte ohne eine Prämedikation durchgeführt werden. Lokal wurden nur subakute Nebenwirkungen bei drei Patienten, einem pro Dosisgruppe, beobachtet. Diese Veränderungen zeigten sich erst als Hautrötungen und Ödeme (Grad I), im Laufe der Therapie entstanden daraus leichte Verbrennungen (Grad I). Ein Patient entwickelte einen Abszess im Tumorbereich. Erst durch die Applikation der höchsten Dosis des DPPG₂-TSL-DOX konnten systemische Veränderungen aufgezeichnet werden. Eine verstärkte systemische Freisetzung des DOX konnte bei einem Patienten (# IX) nicht ausgeschlossen werden, dies könnte den Abfall der Neutrophilenzahl sowie der Leukozytenzahl erklären. Dieser Patient erlitt durch die Therapie Herzveränderungen, welche wahrscheinlich durch die Miterwärmung des Herzens zustande gekommen sind. In der gleichen Dosisgruppe entwickelte ein Patient (# X) eine persistierende Azotämie. Es ist davon auszugehen, dass die maximal tolerierte Dosis in dieser Studie nicht erreicht worden ist. Um die MTD zu evaluieren müsste die Dosis des DPPG₂-TSL-DOX weiter gesteigert werden.

Zusammengefasst waren die aufgezeichneten Nebenwirkungen akzeptabel und ein Tumoransprechen konnte bei allen Patienten ab der Dosis 0,8 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX dokumentiert werden. Diese Therapiekombination besitzt ein hohes Potential bei der Therapie von fortgeschrittenen Fibrosarkomen und führte in der vorliegenden Studie zu guten Erfolgen. Die neue Therapieoption könnte im

Rahmen einer Multimodalitätstherapie einen wichtigen, routinemäßigen Baustein darstellen. Durch eine Tumorzvolumenreduktion kann eine chirurgische Resektion erreicht oder erleichtert werden. Eine effektive Therapie bei Tumoren mit großen Volumina wäre denkbar, wenn verschiedene Applikatorgrößen zur Verfügung stehen würden. Die Kombination aus RHT simultan zur DPPG₂TSL-DOX erfüllt die Anforderungen einer neoadjuvanten Therapie und eine Anwendung beim Menschen im Rahmen der Therapie von Hochrisiko-Weichteilsarkomen wäre denkbar.

In anschließenden Untersuchungen sollen einige Patienten mit einer Kombination aus RHT und freiem DOX mit der Standarddosis 1,0 mg/kg behandelt werden, dadurch könnte die Überlegenheit des DPPG₂-TSL-DOX dargestellt werden. Dafür ist eine prospektive, randomisierte, doppelblinde Studie mit zwei Therapiearmen und ausreichend hohen Patientenzahlen für eine statistische Auswertung des Therapieeffekts erforderlich.

VII. SUMMARY

The combination therapy of feline fibrosarcoma consisting of the intravenous administration of DPPG₂-TSL-DOX in conjunction with regional hyperthermia (RHT) was confirmed to be practicable and easy to perform. The tumours could be uncomplicatedly heated to the target temperature because of their superficial position.

In all dose groups the pharmacokinetics of DPPG₂-TSL-DOX in plasma was measured under the influence of hyperthermia. The documented plasma concentration varied strongly for each patient within a dose group. However, an increased dose of DPPG₂-TSL-DOX led to an increase in the DOX plasma concentration for all patients within the dose group. Furthermore, the area under the curve (AUC) increased with increased dose. This phenomenon can be explained by the limited intake capacity of the mononuclear phagocyte system-cells. Transgression of the intake capacity leads to a higher DOX-plasma concentration.

In the third dose group (1.0 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX), the pharmacokinetics of the DPPG₂-TSL-DOX without the influence of hyperthermia was additionally measured. The influence of hyperthermia upon the release rate of DOX out of DPPG₂-TSL can be graphically illustrated. With just the application of DPPG₂-TSL-DOX a log-linear decrease could be documented. A simultaneous RHT however led to a fast DOX-release from the DPPG₂-TSL, which is characterised by an exponential decrease of the plasma concentration.

The correlation between the administered dose of DPPG₂-TSL-DOX and the measured tissue DOX concentration could not be determined as DOX-tissue concentrations were too low to be detected with the HPLC-method established in the laboratory. Only small samples could be collected with a biopsy, which cannot represent the whole tumour.

Eight out of eleven study patients completed the scheduled therapy sessions. One patient was excluded from the study after the initial examination due to tumour related neurological symptoms (dose group II, 0.8 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX). Reasons for the treatment discontinuation of the two other patients were on the

one hand an abscess formation in the tumour area (dose group II) in one of the patients and on the other hand alterations of the heart (dose group III, 1.0 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX) in the second patient. A surgical resection was nevertheless possible for those two patients. Overall, only one tumour progression (dose group I, 0.6 mg/kg DPPG₂-TSL-DOX) was documented. Except for one stable disease (dose group II) a partial tumour remission could be achieved through the therapy for the remaining eight patients. An increased response rate could be noted with an increased dose.

A tumour excision could be performed by five out of the eight patients who had completed all the therapy sessions. Of those, one patient belonged to the first dose group, one to the second dose group and three to the third group.

The therapy was overall well tolerated. Premedication before the application of DPPG₂-TSL-DOX was not necessary. Only side effects of subacute types were recorded locally for one patient in each dose group. Those alterations appeared first as erythema and oedema, which progressed during the therapy into mild burns. One patient developed an abscess in the tumour area. First systemic side effects were only noted when the highest dose of DPPG₂-TSL-DOX was administered. A systemic release of DOX cannot be excluded for one patient, what could explain the decrease in the neutrophil granulocyte count and in the total leukocyte count of the patient. This patient suffered from, presumably therapy related, heart alterations, which were probably caused by unwanted heating of the heart. In the same dose group another patient developed a persistent azotemia.

In this study, the maximum tolerated dose was most likely not reached and it should be determined in future studies.

In conclusion, the documented side effects were acceptable and, except for one tumour progression, a response to the therapy was observed in all patients. This therapy combination exhibits a great potential for the therapy of advanced stage fibrosarcoma. This therapy option could be a fundamental component in an approach to a multimodal treatment. A surgical excision can be rendered possible or facilitated due to a tumour volume reduction. If different sizes of the

hyperthermia applicator were available, a more effective treatment of tumours with greater volume would perhaps become possible.

The combination of RHT simultaneously with DPPG₂-TSL-DOX fulfils the criteria of a neoadjuvant therapy and the use as a component in the treatment of human high risk soft tissue sarcomas could be possible. In subsequent investigations, several patients should be treated with a combination of RHT and free DOX at the standard dose of 1.0 mg/kg, which could prove the superiority of DPPG₂-TSL-DOX to free DOX. This would require a prospective, randomized, double-blinded study with two therapy arms and a larger number of patients to prove the therapeutical benefit of DPPG₂-TSL-DOX plus RHT compared to free DOX plus RHT.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Allen TM. Pharmacokinetics and Biopharmaceutics of Lipid-Based Drug Formulations: 2007: 49-64.

Anyarambhatla G, Needham D. Enhancement of the phase transition permeability of DPPC Liposomes by incorporation of MPPC: A new temperature-sensitive Liposome for use with mild hyperthermia. *Journal of liposome research* 1999; 9: 491-506.

Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965; 13: 238-52.

Baur A, Stabler A, Wendtner CM, Arbogast S, Rahman SA, Santl M, Issels R, Reiser M. MR-imaging changes of musculoskeletal soft-tissue sarcomas associated with neoadjuvant chemotherapy and hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2003; 19: 391-401.

Ben-Yosef R, Kapp DS. Persistent and/or late complications of combined radiation therapy and hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 1992; 8: 733-45.

Bruggmoser G, Bauchowitz S, Canters R, Crezee H, Ehmann M, Gellermann J, Lamprecht U, Lomax N, Messmer MB, Ott O, Abdel-Rahman S, Schmidt M, Sauer R, Thomsen A, Wessalowski R, van Rhooen G. Guideline for the clinical application, documentation and analysis of clinical studies for regional deep hyperthermia: quality management in regional deep hyperthermia. *Strahlenther Onkol* 2012; 188 Suppl 2: 198-211.

Carminato A, Vascellari M, Marchioro W, Melchiotti E, Mutinelli F. Microchip-associated fibrosarcoma in a cat. *Vet Dermatol* 2011; 22: 565-9.

Cronin K, Page RL, Spodnick G, Dodge R, Hardie EN, Price GS, Ruslander D, Thrall DE. Radiation therapy and surgery for fibrosarcoma in 33 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 1998; 39: 51-6.

Daly MK, Saba CF, Crochik SS, Howerth EW, Kosarek CE, Cornell KK, Roberts RE, Northrup NC. Fibrosarcoma adjacent to the site of microchip implantation in a cat. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 202-5.

Davidson EB, Gregory CR, Kass PH. Surgical excision of soft tissue fibrosarcomas in cats. *Vet Surg* 1997; 26: 265-9.

Dewhirst MW, Sim DA, Sapareto S, Connor WG. Importance of minimum tumor temperature in determining early and long-term responses of spontaneous canine and feline tumors to heat and radiation. *Cancer Res* 1984; 44: 43-50.

Dewhirst MW, Sim DA. The utility of thermal dose as a predictor of tumor and normal tissue responses to combined radiation and hyperthermia. *Cancer Res* 1984; 44: 4772s-80s.

Dewhirst MW, Vujaskovic Z, Jones E, Thrall D. Re-setting the biologic rationale for thermal therapy. *Int J Hyperthermia* 2005; 21: 779-90.

Eckstein C, Guscetti F, Roos M, Martin de las Mulas J, Kaser-Hotz B, Rohrer Bley C. A retrospective analysis of radiation therapy for the treatment of feline vaccine-associated sarcoma. *Vet Comp Oncol* 2009; 7: 54-68.

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 2009; 45: 228-47.

Esplin DG, McGill LD, Meininger AC, Wilson SR. Postvaccination sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 202: 1245-7.

Falk MH, Issels RD. Hyperthermia in oncology. *Int J Hyperthermia* 2001; 17: 1-18.

Fidler IJ, Raz A, Fogler WE, Kirsh R, Bugelski P, Poste G. Design of liposomes to improve delivery of macrophage-augmenting agents to alveolar macrophages. *Cancer Res* 1980; 40: 4460-6.

Gaber MH, Wu NZ, Hong K, Huang SK, Dewhirst MW, Papahadjopoulos D. Thermosensitive liposomes: extravasation and release of contents in tumor microvascular networks. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; 36: 1177-87.

Galettis P, Boutagy J, Ma DD. Daunorubicin pharmacokinetics and the correlation with P-glycoprotein and response in patients with acute leukaemia. *Br J Cancer* 1994; 70: 324-9.

Gastpar R, Gehrman M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, Multhoff G. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 2005; 65: 5238-47.

Gillette SM, Dewhirst MW, Gillette EL, Thrall DE, Page RL, Powers BE, Withrow SJ, Rosner G, Wong C, Sim DA. Response of canine soft tissue sarcomas to radiation or radiation plus hyperthermia: a randomized phase II study. *Int J Hyperthermia* 1992; 8: 309-20.

Giudice C, Stefanello D, Sala M, Cantatore M, Russo F, Romussi S, Travetti O, Di Giancamillo M, Grieco V. Feline injection-site sarcoma: recurrence, tumour grading and surgical margin status evaluated using the three-dimensional histological technique. *Vet J* 2010; 186: 84-8.

Gobar GM, Kass PH. World Wide Web-based survey of vaccination practices, postvaccinal reactions, and vaccine site-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2002; 220: 1477-82.

Gordon KB, Tajuddin A, Guitart J, Kuzel TM, Eramo LR, VonRoenn J. Hand-foot syndrome associated with liposome-encapsulated doxorubicin therapy. *Cancer* 1995; 75: 2169-73.

Greaves P, Williams A, Eve M. First dose of potential new medicines to humans: how animals help. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 226-36.

Gulati M, Bajad S, Singh S, Ferdous AJ, Singh M. Development of liposomal amphotericin B formulation. *J Microencapsul* 1998; 15: 137-51.

Hahn KA, Endicott MM, King GK, Harris-King FD. Evaluation of radiotherapy alone or in combination with doxorubicin chemotherapy for the treatment of cats

with incompletely excised soft tissue sarcomas: 71 cases (1989-1999). *J Am Vet Med Assoc* 2007; 231: 742-5.

Harrington KJ, Mohammadtaghi S, Uster PS, Glass D, Peters AM, Vile RG, Stewart JS. Effective targeting of solid tumors in patients with locally advanced cancers by radiolabeled pegylated liposomes. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 243-54.

Hauck ML, LaRue SM, Petros WP, Poulson JM, Yu D, Spasojevic I, Pruitt AF, Klein A, Case B, Thrall DE, Needham D, Dewhirst MW. Phase I trial of doxorubicin-containing low temperature sensitive liposomes in spontaneous canine tumors. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4004-10.

Haveman J, Smals OA, Rodermond HM. Effects of hyperthermia on the rat bladder: a pre-clinical study on thermometry and functional damage after treatment. *Int J Hyperthermia* 2003; 19: 45-57.

Hendrick MJ, Goldschmidt MH. Do injection site reactions induce fibrosarcomas in cats? *J Am Vet Med Assoc* 1991; 199: 968.

Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS, Wang YY, Somlyo AP. Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology and electron probe microanalytical identification of aluminum. *Cancer Res* 1992; 52: 5391-4.

Hershey AE, Sorenmo KU, Hendrick MJ, Shofer FS, Vail DM. Prognosis for presumed feline vaccine-associated sarcoma after excision: 61 cases (1986-1996). *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216: 58-61.

Hossann M, Wiggenhorn M, Schwerdt A, Wachholz K, Teichert N, Eibl H, Issels RD, Lindner LH. In vitro stability and content release properties of phosphatidylglyceroglycerol containing thermosensitive liposomes. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768: 2491-9.

Hossann M, Wang T, Wiggenhorn M, Schmidt R, Zengerle A, Winter G, Eibl H, Peller M, Reiser M, Issels RD, Lindner LH. Size of thermosensitive liposomes influences content release. *J Control Release* 2010; 147: 436-43.

Hossann M, Syunyaeva Z, Schmidt R, Zengerle A, Eibl H, Issels RD, Lindner LH. Proteins and cholesterol lipid vesicles are mediators of drug release from thermosensitive liposomes. *J Control Release* 2012; 162: 400-6.

Issels RD, Mittermuller J, Gerl A, Simon W, Ortmaier A, Denzlinger C, Sauer H, Wilmanns W. Improvement of local control by regional hyperthermia combined with systemic chemotherapy (ifosfamide plus etoposide) in advanced sarcomas: updated report on 65 patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 1991; 117 Suppl 4: S141-7.

Issels RD, Abdel-Rahman S, Wendtner C, Falk MH, Kurze V, Sauer H, Aydemir U, Hiddemann W. Neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia (RHT) for locally advanced primary or recurrent high-risk adult soft-tissue sarcomas (STS) of adults: long-term results of a phase II study. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1599-608.

Issels RD. Hyperthermia adds to chemotherapy. *Eur J Cancer* 2008; 44: 2546-54.

Issels RD, Lindner LH, Verweij J, Wust P, Reichardt P, Schem BC, Abdel-Rahman S, Daugaard S, Salat C, Wendtner CM, Vujaskovic Z, Wessalowski R, Jauch KW, Durr HR, Ploner F, Baur-Melnyk A, Mansmann U, Hiddemann W, Blay JY, Hohenberger P, European Organisation for R, Treatment of Cancer Soft T, Bone Sarcoma G, European Society for Hyperthermic O. Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol* 2010; 11: 561-70.

Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005; 307: 58-62.

Jones EL, Oleson JR, Prosnitz LR, Samulski TV, Vujaskovic Z, Yu D, Sanders LL, Dewhirst MW. Randomized trial of hyperthermia and radiation for superficial tumors. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3079-85.

Kass PH, Barnes WG, Jr., Spangler WL, Chomel BB, Culbertson MR. Epidemiologic evidence for a causal relation between vaccination and fibrosarcoma tumorigenesis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203: 396-405.

Kass PH, Spangler WL, Hendrick MJ, McGill LD, Esplin DG, Lester S, Slater M, Meyer EK, Boucher F, Peters EM, Gobar GG, Htoo T, Decile K. Multicenter case-control study of risk factors associated with development of vaccine-associated sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223: 1283-92.

Kent MS. Cats and chemotherapy: treat as 'small dogs' at your peril. *J Feline Med Surg* 2013; 15: 419-24.

Kleiter M, Tichy A, Willmann M, Pagitz M, Wolfesberger B. Concomitant liposomal doxorubicin and daily palliative radiotherapy in advanced feline soft tissue sarcomas. *Vet Radiol Ultrasound* 2010; 51: 349-55.

Kneidl B, Peller M, Winter G, Lindner LH, Hossann M. Thermosensitive liposomal drug delivery systems: state of the art review. *Int J Nanomedicine* 2014; 9: 4387-98.

Kobayashi T, Hauck ML, Dodge R, Page RL, Price GS, Williams LE, Hardie EM, Mathews KG, Thrall DE. Preoperative radiotherapy for vaccine associated sarcoma in 92 cats. *Vet Radiol Ultrasound* 2002; 43: 473-9.

Kong G, Dewhirst MW. Hyperthermia and liposomes. *Int J Hyperthermia* 1999; 15: 345-70.

Kong G, Anyarambhatla G, Petros WP, Braun RD, Colvin OM, Needham D, Dewhirst MW. Efficacy of liposomes and hyperthermia in a human tumor xenograft model: importance of triggered drug release. *Cancer Res* 2000; 60: 6950-7.

Koning GA, Eggermont AM, Lindner LH, ten Hagen TL. Hyperthermia and thermosensitive liposomes for improved delivery of chemotherapeutic drugs to solid tumors. *Pharm Res* 2010; 27: 1750-4.

Kubinyi H. Drug research: myths, hype and reality. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 665-8.

Ladlow J. Injection site-associated sarcoma in the cat: treatment recommendations and results to date. *J Feline Med Surg* 2013; 15: 409-18.

Laginha KM, Verwoert S, Charrois GJ, Allen TM. Determination of doxorubicin levels in whole tumor and tumor nuclei in murine breast cancer tumors. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 6944-9.

Landon CD, Park JY, Needham D, Dewhirst MW. Nanoscale Drug Delivery and Hyperthermia: The Materials Design and Preclinical and Clinical Testing of Low Temperature-Sensitive Liposomes Used in Combination with Mild Hyperthermia in the Treatment of Local Cancer. *Open Nanomed J* 2011; 3: 38-64.

Lenz HJ. Management and preparedness for infusion and hypersensitivity reactions. *Oncologist* 2007; 12: 601-9.

Leopold KA, Dewhirst M, Samulski T, Harrelson J, Tucker JA, George SL, Dodge RK, Grant W, Clegg S, Prosnitz LR, et al. Relationships among tumor temperature, treatment time, and histopathological outcome using preoperative hyperthermia with radiation in soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 22: 989-98.

Lester S, Clemett T, Burt A. Vaccine site-associated sarcomas in cats: clinical experience and a laboratory review (1982-1993). *J Am Anim Hosp Assoc* 1996; 32: 91-5.

Li L, ten Hagen TL, Hossann M, Suss R, van Rhooen GC, Eggermont AM, Haemmerich D, Koning GA. Mild hyperthermia triggered doxorubicin release from optimized stealth thermosensitive liposomes improves intratumoral drug delivery and efficacy. *J Control Release* 2013; 168: 142-50.

Limmer S, Hahn J, Schmidt R, Wachholz K, Zengerle A, Lechner K, Eibl H, Issels RD, Hossann M, Lindner LH. Gemcitabine treatment of rat soft tissue sarcoma with phosphatidylglycerol-based thermosensitive liposomes. *Pharm Res* 2014; 31: 2276-86.

Lindner LH, Issels R. [Thermosensitive liposomes for regional hyperthermia]. *Dtsch Med Wochenschr* 2003; 128: 2020-2.

Lindner LH, Eichhorn ME, Eibl H, Teichert N, Schmitt-Sody M, Issels RD, Dellian M. Novel temperature-sensitive liposomes with prolonged circulation time. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2168-78.

Lindner LH, Hossann M. Factors affecting drug release from liposomes. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2010; 13: 111-23.

Lindner LH, Issels RD. Hyperthermia in soft tissue sarcoma. *Curr Treat Options Oncol* 2011; 12: 12-20.

Lyass O, Uziely B, Ben-Yosef R, Tzemach D, Heshing NI, Lotem M, Brufman G, Gabizon A. Correlation of toxicity with pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 1037-47.

Macy D, Guillermo Couto C. Prevention and treatment of injection-site sarcomas. *J Feline Med Surg* 2001; 3: 169-70.

Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 71-9.

Manzoor AA, Lindner LH, Landon CD, Park JY, Simnick AJ, Dreher MR, Das S, Hanna G, Park W, Chilkoti A, Koning GA, ten Hagen TL, Needham D, Dewhirst MW. Overcoming limitations in nanoparticle drug delivery: triggered, intravascular release to improve drug penetration into tumors. *Cancer Res* 2012; 72: 5566-75.

Martano M, Morello E, Ughetto M, Iussich S, Petterino C, Cascio P, Buracco P. Surgery alone versus surgery and doxorubicin for the treatment of feline injection-site sarcomas: a report on 69 cases. *Vet J* 2005; 170: 84-90.

Martano M, Morello E, Buracco P. Feline injection-site sarcoma: past, present and future perspectives. *Vet J* 2011; 188: 136-41.

Matteucci ML, Anyarambhatla G, Rosner G, Azuma C, Fisher PE, Dewhirst MW, Needham D, Thrall DE. Hyperthermia increases accumulation of technetium-99m-labeled liposomes in feline sarcomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 3748-55.

Mauldin GN, Matus RE, Patnaik AK, Bond BR, Mooney SC. Efficacy and toxicity of doxorubicin and cyclophosphamide used in the treatment of selected malignant tumors in 23 cats. *J Vet Intern Med* 1988; 2: 60-5.

McEntee MC, Page RL. Feline vaccine-associated sarcomas. *J Vet Intern Med* 2001; 15: 176-82.

Milani V, Noessner E, Ghose S, Kuppner M, Ahrens B, Scharner A, Gastpar R, Issels RD. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. *Int J Hyperthermia* 2002; 18: 563-75.

Milani V, Pazos M, Issels RD, Buecklein V, Rahman S, Tschoep K, Schaffer P, Wilkowski R, Duehmke E, Schaffer M. Radiochemotherapy in combination with regional hyperthermia in preirradiated patients with recurrent rectal cancer. *Strahlenther Onkol* 2008; 184: 163-8.

Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 583-92.

Needham D, Anyarambhatla G, Kong G, Dewhirst MW. A new temperature-sensitive liposome for use with mild hyperthermia: characterization and testing in a human tumor xenograft model. *Cancer Res* 2000; 60: 1197-201.

Noessner E, Gastpar R, Milani V, Brandl A, Hutzler PJ, Kuppner MC, Roos M, Kremmer E, Asea A, Calderwood SK, Issels RD. Tumor-derived heat shock protein 70 peptide complexes are cross-presented by human dendritic cells. *J Immunol* 2002; 169: 5424-32.

O'Keefe DA, Sisson DD, Gelberg HB, Schaeffer DJ, Krawiec DR. Systemic toxicity associated with doxorubicin administration in cats. *J Vet Intern Med* 1993; 7: 309-17.

Ogilvie GK, Reynolds HA, Richardson RC, Withrow SJ, Norris AM, Henderson RA, Klausner JS, Fowler JD, McCaw D. Phase II evaluation of doxorubicin for treatment of various canine neoplasms. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 1580-3.

Oleson JR, Samulski TV, Leopold KA, Clegg ST, Dewhirst MW, Dodge RK, George SL. Sensitivity of hyperthermia trial outcomes to temperature and time:

implications for thermal goals of treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 25: 289-97.

Overgaard J, Gonzalez Gonzalez D, Hulshof MC, Arcangeli G, Dahl O, Mella O, Bentzen SM. Hyperthermia as an adjuvant to radiation therapy of recurrent or metastatic malignant melanoma. A multicentre randomized trial by the European Society for Hyperthermic Oncology. 1996. *Int J Hyperthermia* 2009; 25: 323-34.

Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, Mayhew E, Matthay K, Huang SK, Lee KD, Woodle MC, Lasic DD, Redemann C, et al. Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 11460-4.

Phelps HA, Kuntz CA, Milner RJ, Powers BE, Bacon NJ. Radical excision with five-centimeter margins for treatment of feline injection-site sarcomas: 91 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2011; 239: 97-106.

Poirier VJ, Thamm DH, Kurzman ID, Jeglum KA, Chun R, Obradovich JE, O'Brien M, Fred RM, 3rd, Phillips BS, Vail DM. Liposome-encapsulated doxorubicin (Doxil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcoma in cats. *J Vet Intern Med* 2002; 16: 726-31.

Poste G, Bucana C, Raz A, Bugelski P, Kirsh R, Fidler IJ. Analysis of the fate of systemically administered liposomes and implications for their use in drug delivery. *Cancer Res* 1982; 42: 1412-22.

Romanowski R, Schott C, Issels R, Klingebiel T, Treuner J, Jurgens H, Gobel U, Goldschmitt-Wuttge B, Feldmann H, Haas R, et al. [Regional hyperthermia with systemic chemotherapy in children and adolescents: feasibility and clinical follow-up of 34 intensively pretreated patients with prognostically unfavorable tumor diseases]. *Klin Padiatr* 1993; 205: 249-56.

Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 191: 423-34.

Schlemmer M, Wendtner CM, Issels RD. Ifosfamide with regional hyperthermia in soft-tissue sarcomas. *Oncology* 2003; 65 Suppl 2: 76-9.

Schmidt R. Neuartige thermosensitive Liposomen zur zielgerichteten Therapie solider Tumoren - Charakterisierung in vitro und in vivo, Diss. med. vet. München 2011

Schwartz HS, Grindey GB. Adriamycin and daunorubicin: a comparison of antitumor activities and tissue uptake in mice following immunosuppression. *Cancer Res* 1973; 33: 1837-44.

Seguin B. Injection site sarcomas in cats. *Clin Tech Small Anim Pract* 2002; 17: 168-73.

Sherar M, Liu FF, Pintilie M, Levin W, Hunt J, Hill R, Hand J, Vernon C, van Rhoon G, van der Zee J, Gonzalez DG, van Dijk J, Whaley J, Machin D. Relationship between thermal dose and outcome in thermoradiotherapy treatments for superficial recurrences of breast cancer: data from a phase III trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997; 39: 371-80.

Srivastav A, Kass PH, McGill LD, Farver TB, Kent MS. Comparative vaccine-specific and other injectable-specific risks of injection-site sarcomas in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2012; 241: 595-602.

Stangl S, Gehrmann M, Riegger J, Kuhs K, Riederer I, Sievert W, Hube K, Mocikat R, Dressel R, Kremmer E, Pockley AG, Friedrich L, Vigh L, Skerra A, Multhoff G. Targeting membrane heat-shock protein 70 (Hsp70) on tumors by cmHsp70.1 antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 733-8.

Szebeni J, Muggia F, Gabizon A, Barenholz Y. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. *Adv Drug Deliv Rev* 2011; 63: 1020-30.

Thrall DE, Prescott DM, Samulski TV, Dewhirst MW, Cline JM, Lee J, Page RL, Oleson JR. Serious toxicity associated with annular microwave array induction of whole-body hyperthermia in normal dogs. *Int J Hyperthermia* 1992; 8: 23-32.

Thrall DE, LaRue SM, Yu D, Samulski T, Sanders L, Case B, Rosner G, Azuma C, Poulson J, Pruitt AF, Stanley W, Hauck ML, Williams L, Hess P, Dewhirst MW. Thermal dose is related to duration of local control in canine sarcomas treated with thermoradiotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 5206-14.

Thrall DE, Maccarini P, Stauffer P, Macfall J, Hauck M, Snyder S, Case B, Linder K, Lan L, McCall L, Dewhirst MW. Thermal dose fractionation affects tumour physiological response. *Int J Hyperthermia* 2012; 28: 431-40.

van der Zee J, Gonzalez Gonzalez D, van Rhoon GC, van Dijk JD, van Putten WL, Hart AA. Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial. Dutch Deep Hyperthermia Group. *Lancet* 2000; 355: 1119-25.

Wang JC, Liu XY, Lu WL, Chang A, Zhang Q, Goh BC, Lee HS. Pharmacokinetics of intravenously administered stealth liposomal doxorubicin modulated with verapamil in rats. *Eur J Pharm Biopharm* 2006; 62: 44-51.

Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 6449-65.

Wendtner CM, Abdel-Rahman S, Krych M, Baumert J, Lindner LH, Baur A, Hiddemann W, Issels RD. Response to neoadjuvant chemotherapy combined with regional hyperthermia predicts long-term survival for adult patients with retroperitoneal and visceral high-risk soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3156-64.

Williams LE, Banerji N, Klausner JS, Kapur V, Kanjilal S. Establishment of two vaccine-associated feline sarcoma cell lines and determination of in vitro chemosensitivity to doxorubicin and mitoxantrone. *Am J Vet Res* 2001; 62: 1354-7.

Wust P, Gellermann J, Harder C, Tilly W, Rau B, Dinges S, Schlag P, Budach V, Felix R. Rationale for using invasive thermometry for regional hyperthermia of pelvic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 41: 1129-37.

Wust P, Hegewisch-Becker S, Issels R. [Hyperthermia: current status and therapeutic results]. Dtsch Med Wochenschr 2003; 128: 2023-9.

Yarmolenko PS, Moon EJ, Landon C, Manzoor A, Hochman DW, Viglianti BL, Dewhirst MW. Thresholds for thermal damage to normal tissues: an update. Int J Hyperthermia 2011; 27: 320-43.

Yatvin MB, Weinstein JN, Dennis WH, Blumenthal R. Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. Science 1978; 202: 1290-3.

Yatvin MB, Muhlsiepen H, Porschen W, Weinstein JN, Feinendegen LE. Selective delivery of liposome-associated cis-dichlorodiammineplatinum(II) by heat and its influence on tumor drug uptake and growth. Cancer Res 1981; 41: 1602-7.

Zimmermann K. Doxorubicin-beladene thermosensitive Phosphatidyl diglycerin-Liposomen mit simultaner regionaler Hyperthermie als Therapieoption des inoperablen feline Fibrosarkoms, Diss.med.vet. München 2014

IX. ANHANG

1. Eigenschaften der Studienpatienten

Dosisgruppe	Patient #	Tumorstatus	Tumorlokalisation	Tumorzvolumen vor 1. Therapie (cm ³)	Tumorzvolumen Durchschnitt (cm ³)	Tumorzvolumen Median (cm ³)
1	I	Primärtumor	Interskapulär	59,5	62,9	59,5
	II	Primärtumor	Interskapulär	22,2		
	III	1. Rezidiv	Rechte Thoraxwand	106,9		
2	IV	7. Rezidiv	Interskapulär	64,3	68,2	37,3
	V	Primärtumor	Interskapulär	189,8		
	VI	1. Rezidiv	Interskapulär	8,2		
	VII	Primärtumor	Linke Thoraxwand	10,4		
3	VIII	Primärtumor	Interskapulär	18,4	9,9	8,5
	IX	Primärtumor	Rechte Thoraxwand	4,1		
	X	1. Rezidiv	Rechte Thoraxwand	7,4		
	XI	Primärtumor	Linke Thoraxwand	9,6		

2. Therapieprotokoll

2.1. Therapieprotokoll Dosisgruppe I und II

	Eingangs- Untersuchung	Zyklus A Tag 0	Tag 7	Zyklus B Tag 14	Tag 21	Zyklus C Tag 28	Tag 35	Zyklus D Tag 42	Tag 49	Zyklus E Tag 56	Tag 63	Zyklus F Tag 70	Tag 77 Abschluss- Untersuchung
Klinische Allgemeinuntersuchung	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Tumorausmessung	X	X	X*	X	X*	X	X*	X	X*	X	X*	X	X
Staging ¹	X												X
PET-MRT	X				X								X
Labor ²	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
DPPG ₂ -TSL-DOX		X		X		X		X		X		X	
RHT ³		X		X		X		X		X		X	
Tumorbiopsie		X		X		X		X		X		X	
Blutentnahme Pharmakokinetik**		# III		# II		# I							

*: Der Tumor wurde nicht ausgemessen, wenn die Kontrolle beim Haustierarzt durchgeführt wurde. **: Blutentnahme für die Pharmakokinetik fand in der Dosisgruppe II bei Zyklus A statt. ¹Thoraxröntgen, Sonographie Abdomen, Sonographie Herz; ²Blutbild, Organprofil; ³60 Minuten

2.2. Therapieprotokoll Dosisgruppe III; sowie Patient # V, Dosisgruppe II

	Eingangsuntersuchung	Zyklus A Tag 0	Tag 7	Zyklus B Tag 14	Tag 21	Zyklus C Tag 28	Tag 35
Klinische Allgemeinuntersuchung	X	X	X	X	X	X	X
Tumorausmessung	X	X	X*	X	X*	X	X*
Staging ¹	X						
PET-MRT ²	X				X		
Labor ³	X	X	X	X	X	X	X
DPPG ₂ -TSL-DOX		X		X		X	
RHT ⁴				X		X	
Tumorbiopsie		X		X		# V	
Blutentnahme Pharmakokinetik		X		X			

	Zyklus D Tag 42	Tag 49	Zyklus E Tag 56	Tag 63	Zyklus F Tag 70	Tag 77	Zyklus G Tag 84	Tag 91 Abschluss- Untersuchung
Klinische Allgemeinuntersuchung	X	X	X	X	X	X	X	X
Tumorausmessung	X	X*	X	X*	X	X*	X	X
Staging ¹								X
PET-MRT ²								X
Labor ³	X	X	X	X	X	X	X	X
DPPG ₂ -TSL-DOX	X		X		X		X	
RHT ⁴	X		X		X		X	
Tumorbiopsie	# V		# V		# V		# V	
Blutentnahme Pharmakokinetik								

*: Der Tumor wurde nicht ausgemessen, wenn die Kontrolle beim Haustierarzt durchgeführt wurde. ¹Thoraxröntgen, Sonographie Abdomen, Sonographie Herz; ² Bei Patient # V MRT bei Eingangsuntersuchung und Abschlussuntersuchung; ³Blutbild, Organprofil; ⁴60 Minuten

3. Tumoransprechen der Patienten

Dosisgruppe	Patient #	Tumorzvolumen vor Therapie (cm ³)	Tumorzvolumen nach Therapie (cm ³)	Veränderung Tumorzvolumen (%)	Therapeutischer Effekt	Chirurgische Exzision	Strahlentherapie
1	I	59,6	37,1	-37,7	Partielle Remission	-	-
	II	22,2	4,7	-78,8	Partielle Remission	+	-
	III	106,9	293,5	+174,4	Progressive Erkrankung	-	-
2	IV	64,3	-	-	-	-	-
	V	189,8	21,3	-89,0	Partielle Remission	-	-
	VI	8,2	5,8	-29,2	Stabile Erkrankung	+	Kurativ
	VII	10,4	1,6	-84,6	Partielle Remission	+	Palliativ
3	VIII	18,4	0,34	-95,4	Partielle Remission	+	Kurativ
	IX	4,1	2,2	-47,1	Partielle Remission	+	Palliativ
	X	7,4	4,2	-43,2	Partielle Remission	+	-
	XI	9,6	1,9	-80,1	Partielle Remission	+	Kurativ

4. Charakterisierung der eingesetzten DPPG₂-TSL-DOX-Chargen

Charge	Konzentration DOX (mM)	DOX:lipid (mol/mol)	Z average (nm)	PDI
23/07D	2,16	0,13	153	0,10
23/12D	2,80	0,11	165	0,07
23/15D	4,56	0,14	127	0,10
23/20D	4,34	0,13	125	0,10
23/28D	3,34	0,09	178	0,16
24/01D	3,87	0,12	138	0,21
24/03D	4,27	0,12	142	0,24
24/06D	3,93	0,11	168	0,19
24/09D	4,95	0,15	131	0,16
24/11D	5,37	0,14	122	0,09
24/14D	3,46	0,12	126	0,09
24/15D	2,42	0,14	120	0,07
24/16D	2,35	0,10	117	0,05
25/01D	4,12	0,12	121	0,17

Z average: mittlere Partikelgröße; PDI: Polydispersitätsindex

5. Hyperthermie-Daten

5.1. Zusammenfassung

		Zyklus B CEM 43°C	Zyklus C CEM 43°C	Zyklus D CEM 43°C	Zyklus E CEM 43°C	Zyklus F CEM 43°C	Zyklus G CEM 43°C	
Anzahl der Zyklen		10	9	10	9	8	8	Mittel
<u>Therapiewerte</u>								/Stdabw
Mean	Total CEM 43°C	19,2	44,6	75,5	52,8	72,8	78,7	303,5
Median		13,6	14,1	14,7	14,4	21,9	14,3	81,8
Stdabw		13,4	62,5	90,9	61,3	90,9	141,1	315,2
Mean	Mittel	41,8	42,4	42,6	42,4	42,5	42,5	42,3
Stdabw		0,4	0,8	0,9	0,8	1,4	1,0	0,7
Mean	T90	41,2	42,2	41,7	41,4	41,5	42,1	41,4
Stdabw		0,6	0,9	0,8	0,7	2,4	0,8	0,4
Mean	T50 (MEDIAN)	42,0	42,5	42,9	42,5	42,6	42,6	42,4
Stdabw		0,5	1,0	1,2	0,9	1,4	1,0	0,8
Mean	Tmax	43,0	43,1	44,0	43,9	44,0	44,0	44,8
Stdabw		0,8	1,2	2,0	1,8	1,5	2,6	2,5
Mean	Tmin	39,7	40,7	40,3	39,4	40,1	40,7	38,2
Stdabw		1,4	1,3	1,5	2,2	2,4	1,8	1,7
Mean	Anzahl Messpunkte	59,9	60,0	58,6	60,1	60,6	60,0	
Stdabw		0,3	0,0	6,9	0,3	1,7	0,0	
<u>Aufheizphase</u>								
Mean	Dauer Aufheizen	7,8	8,1	7,0	8,8	8,5	8,6	
Median		8,5	6,5	7,0	7,0	7,5	7,5	
Stdabw		2,3	3,7	1,9	4,0	2,5	3,2	

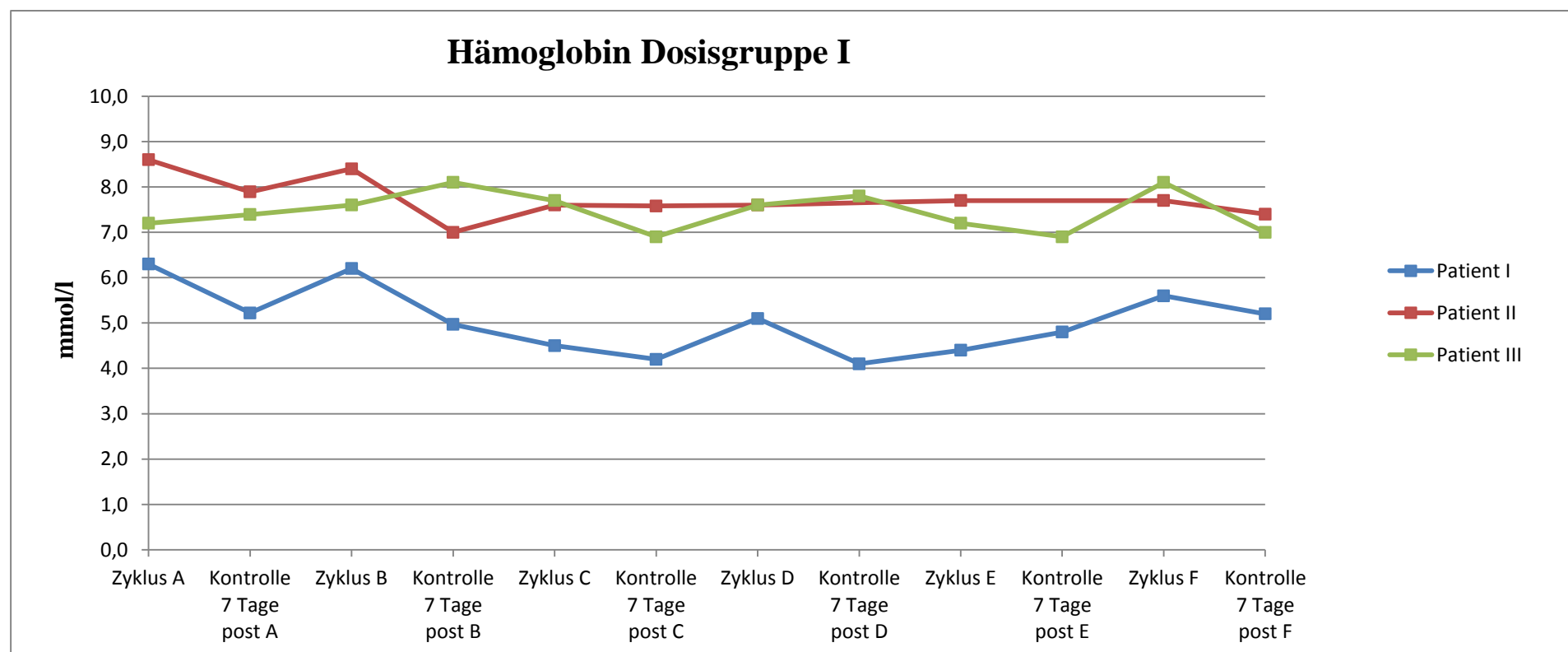
5.2. Hyperthermiedaten der Therapiegruppen

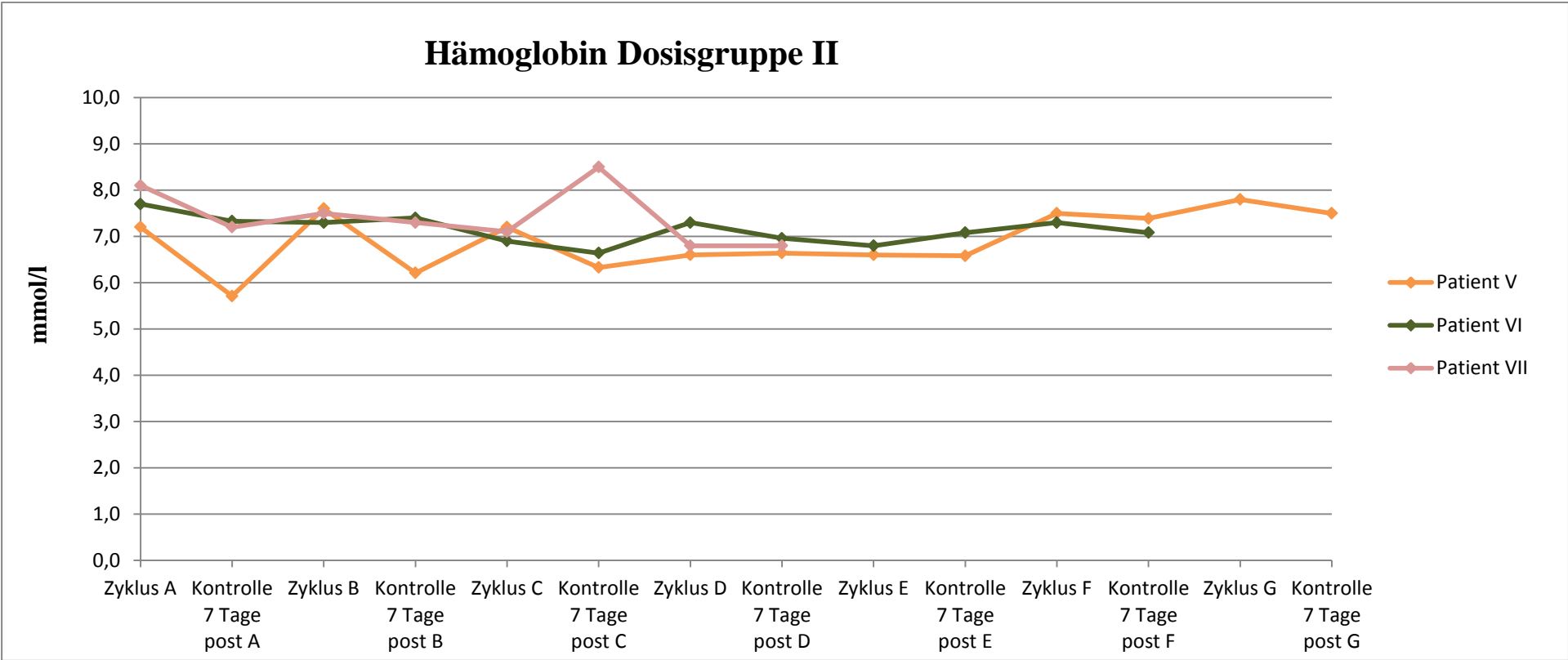
		Dosisgruppe I	Dosisgruppe II	Dosisgruppe III
T 50 (°C)	Median	42,9	42,0	42,0
	Min	41,4	41,9	41,8
	Max	44,9	45,0	42,0
T 90 (°C)	Median	41,4	41,9	41,9
	Min	37,7	39,9	41,2
	Max	44,8	44,8	41,9
CEM 43 °C	Median	50,4	14,4	41,0
Dauer der Aufheizphase (Min)	Median	7	6,5	7

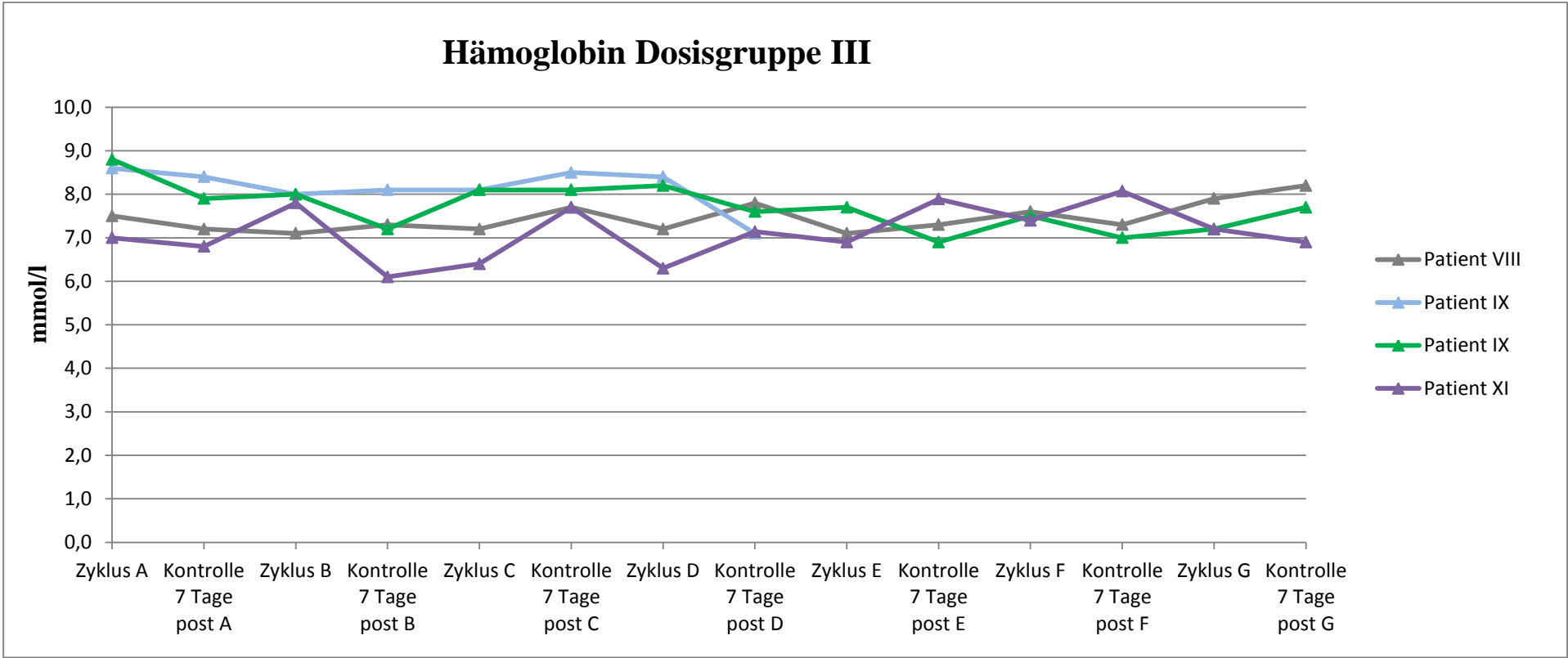
6. Systemische Toxizität

6.1. Erythrozyten

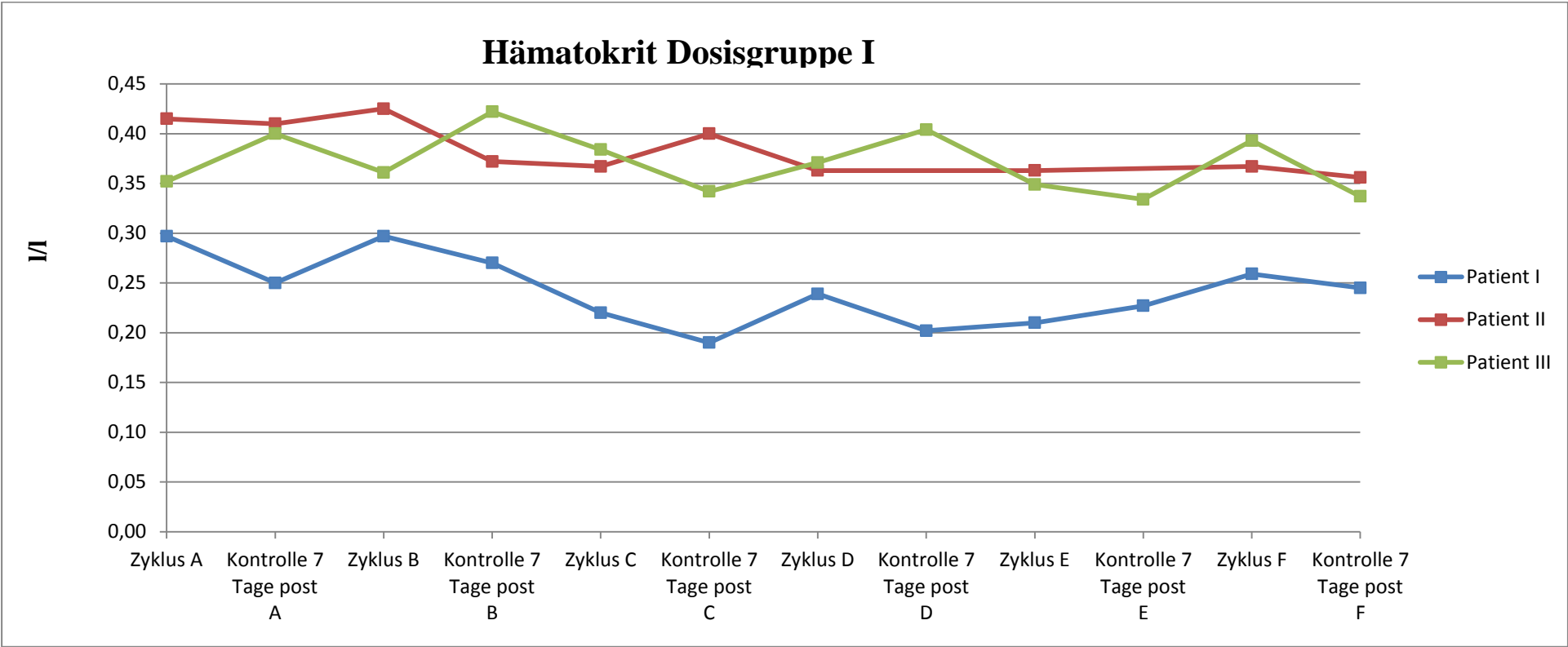
6.1.1. Hämoglobin

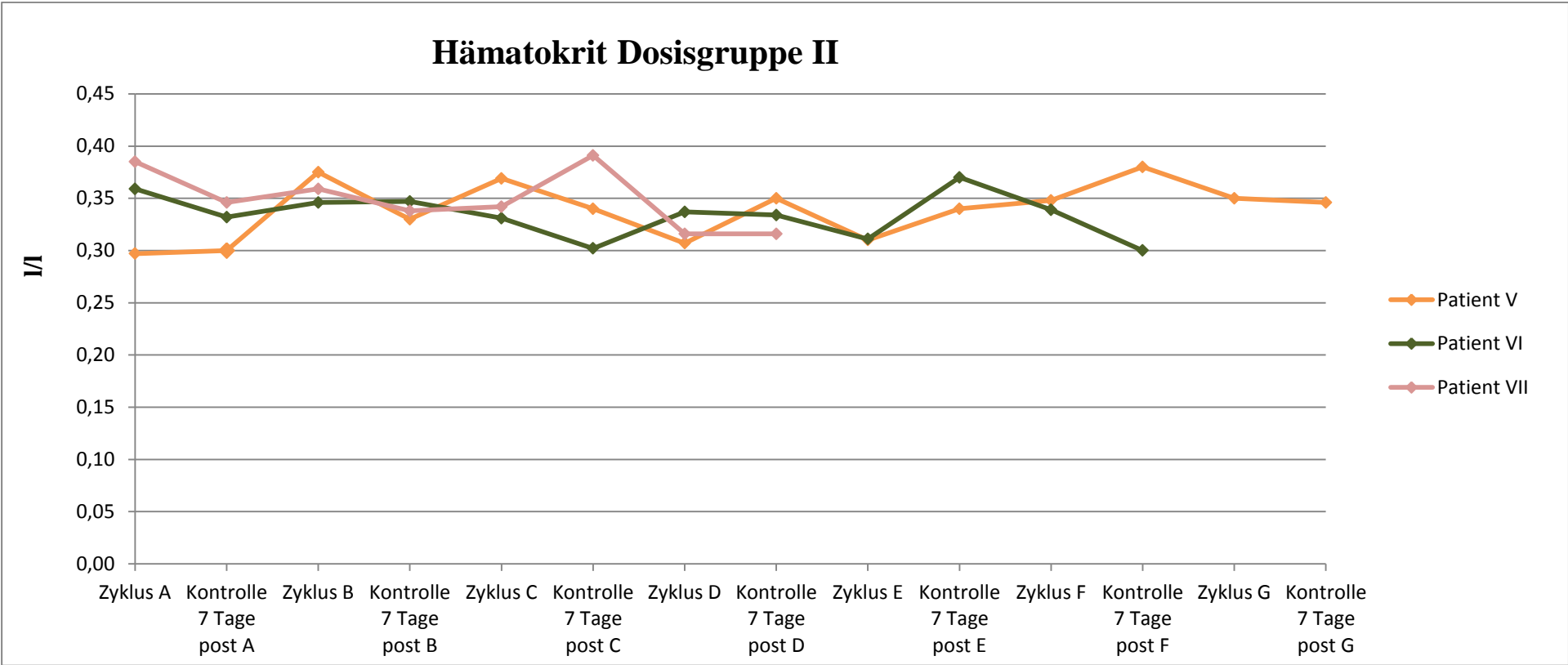


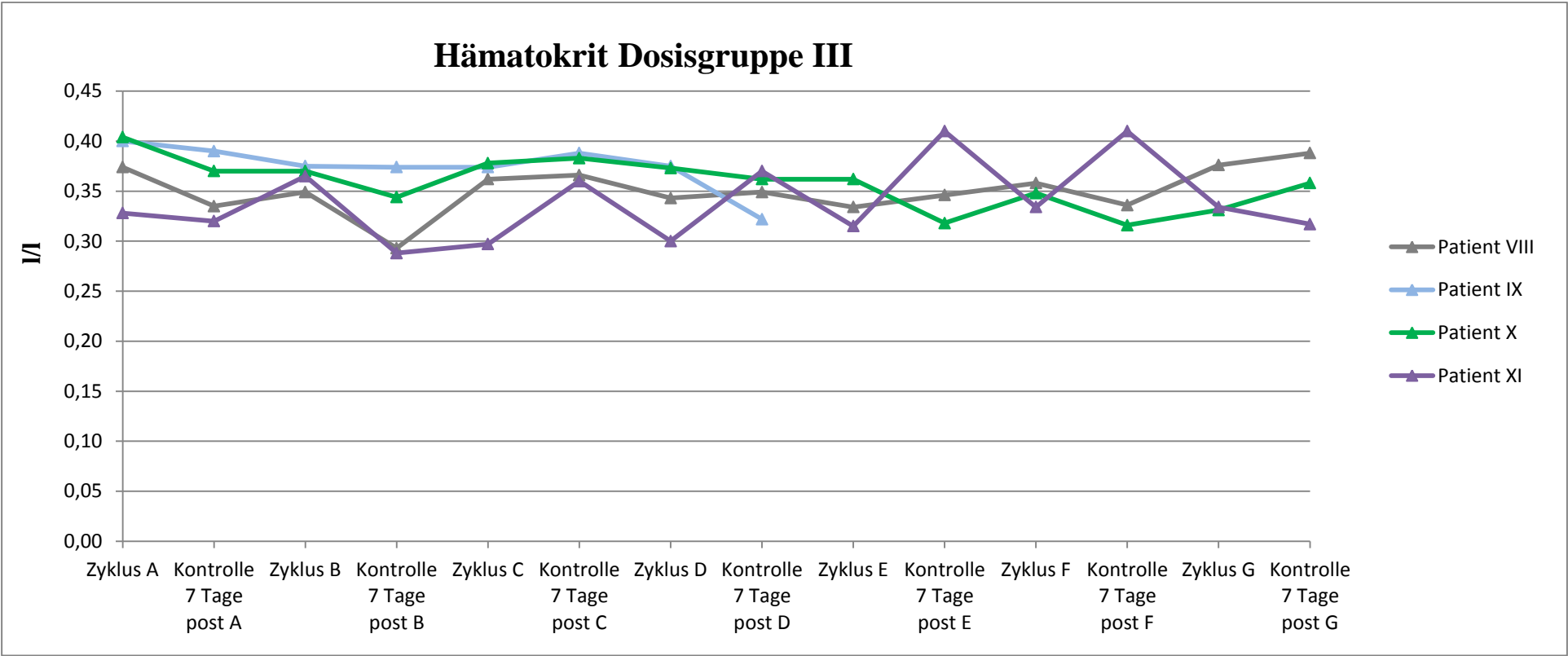




6.1.2. Hämatokrit

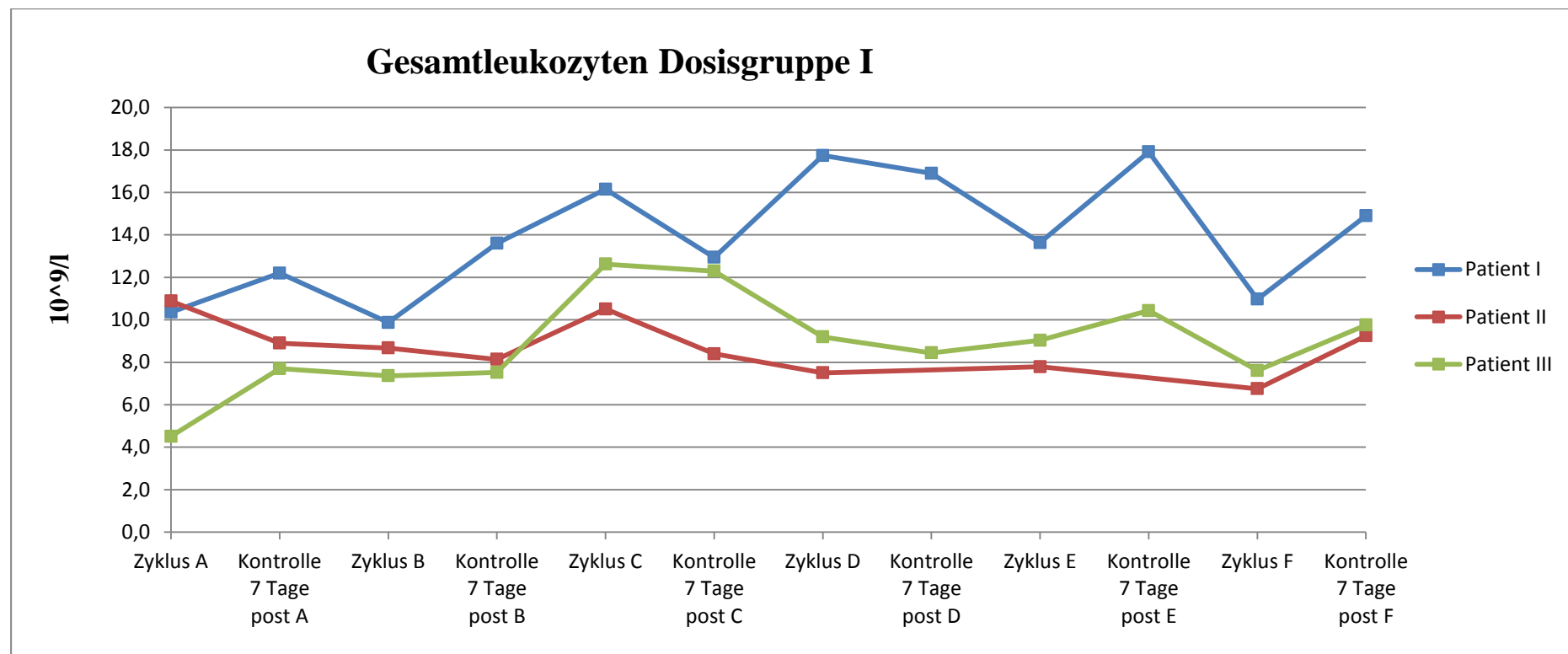


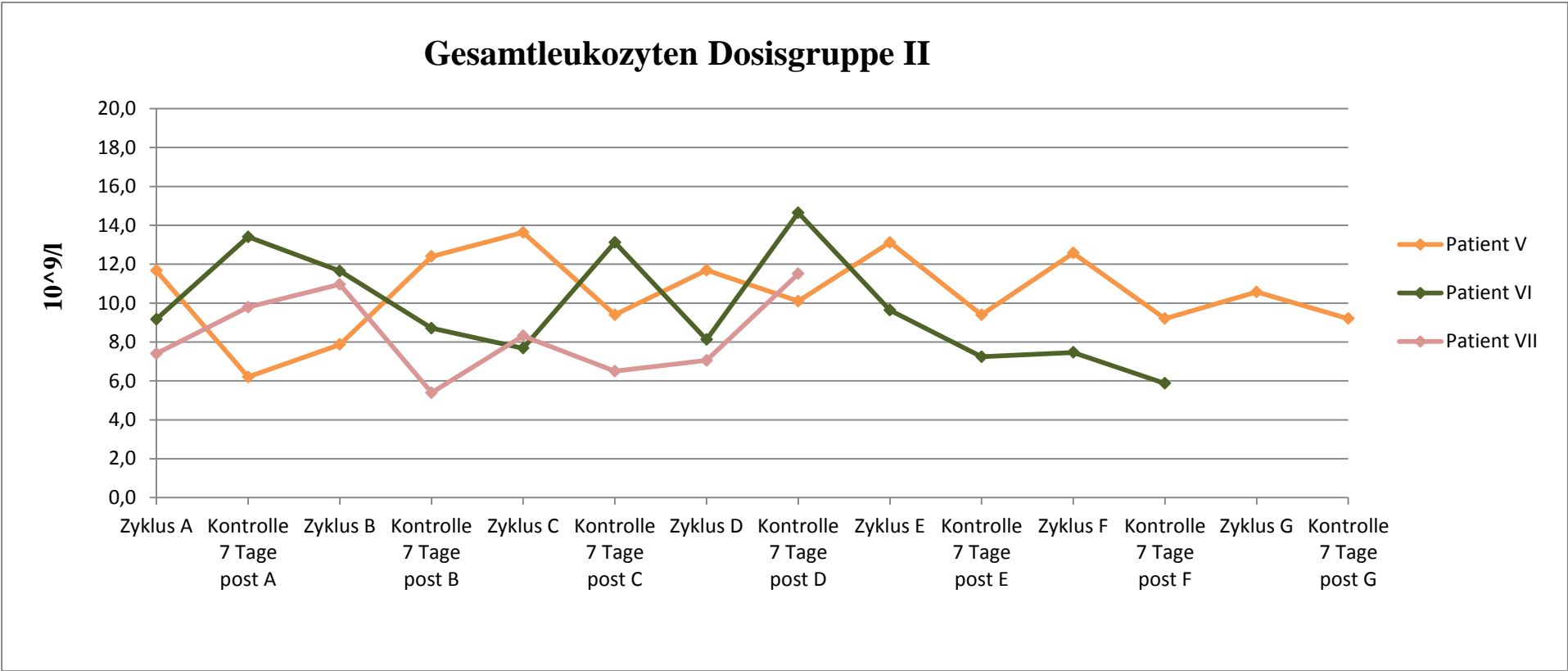


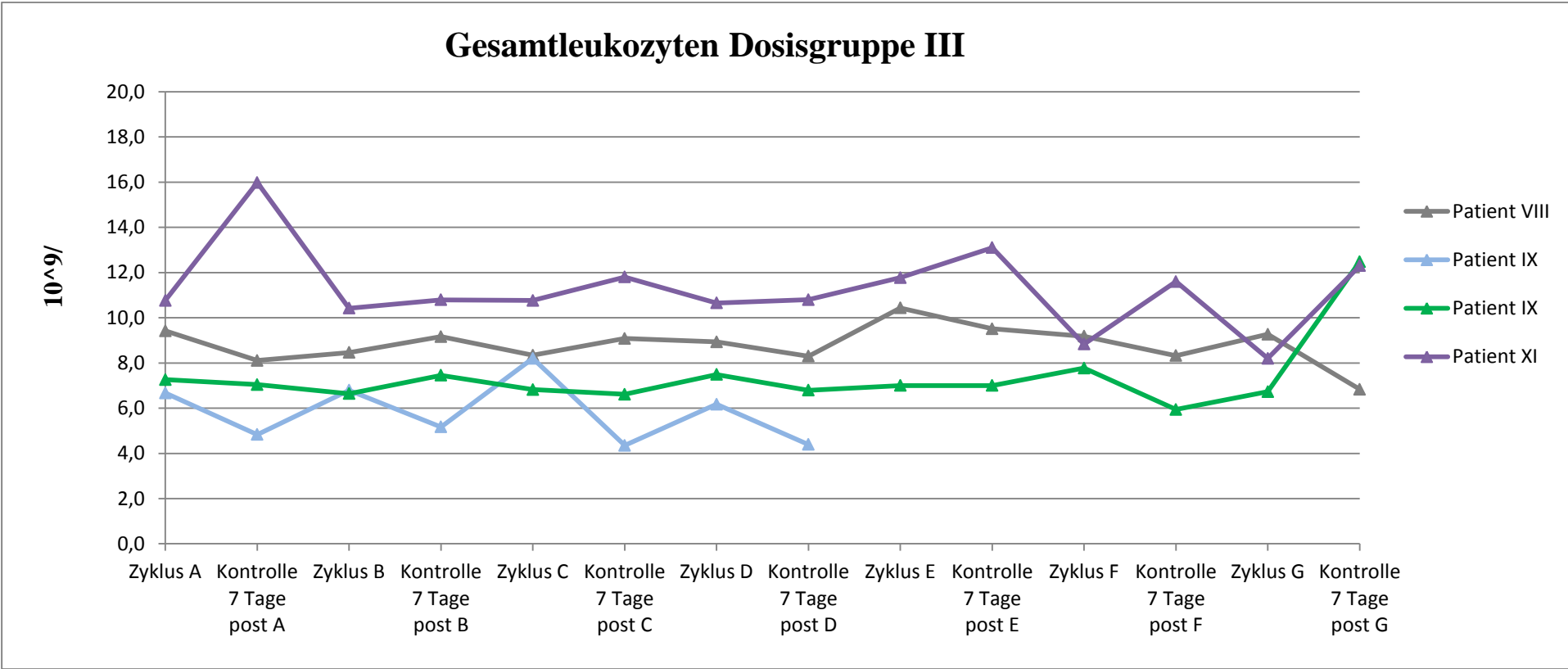


6.2. Leukozyten

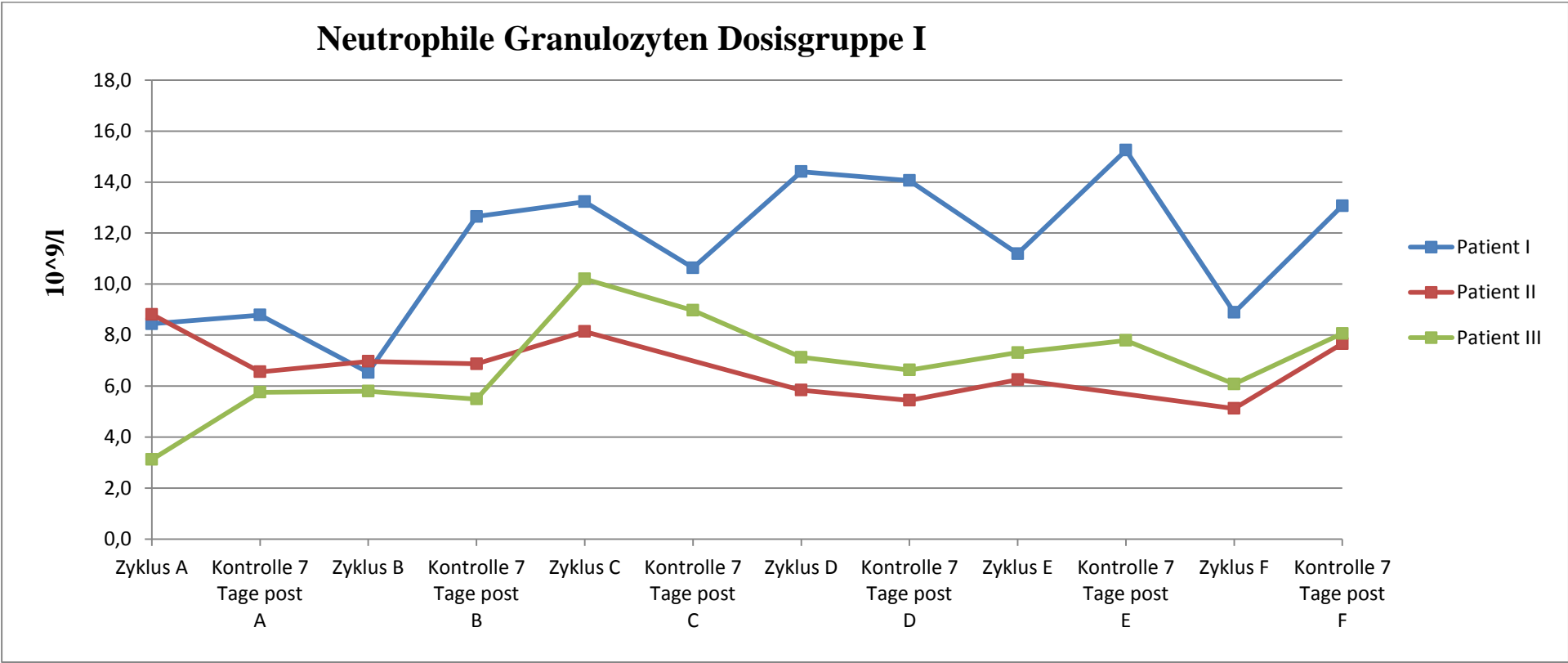
6.2.1. Gesamtleukozyten

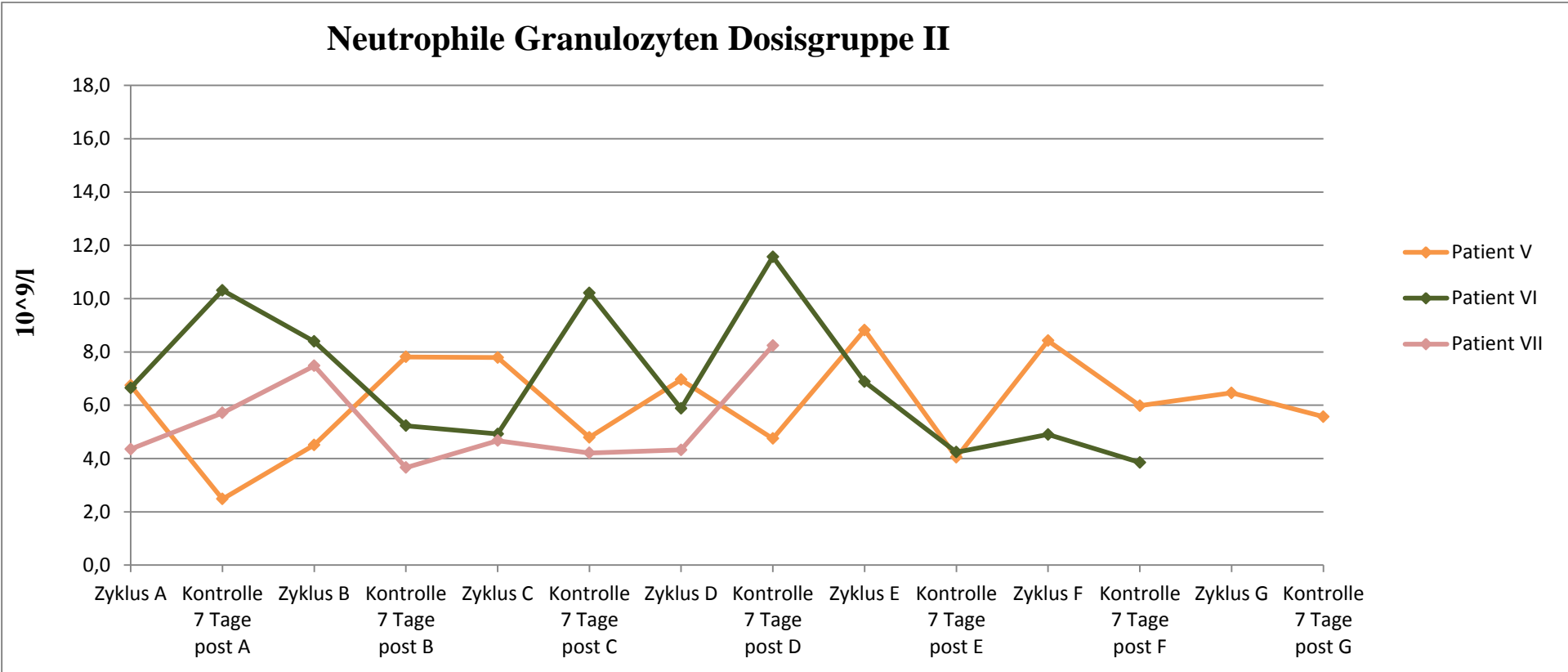


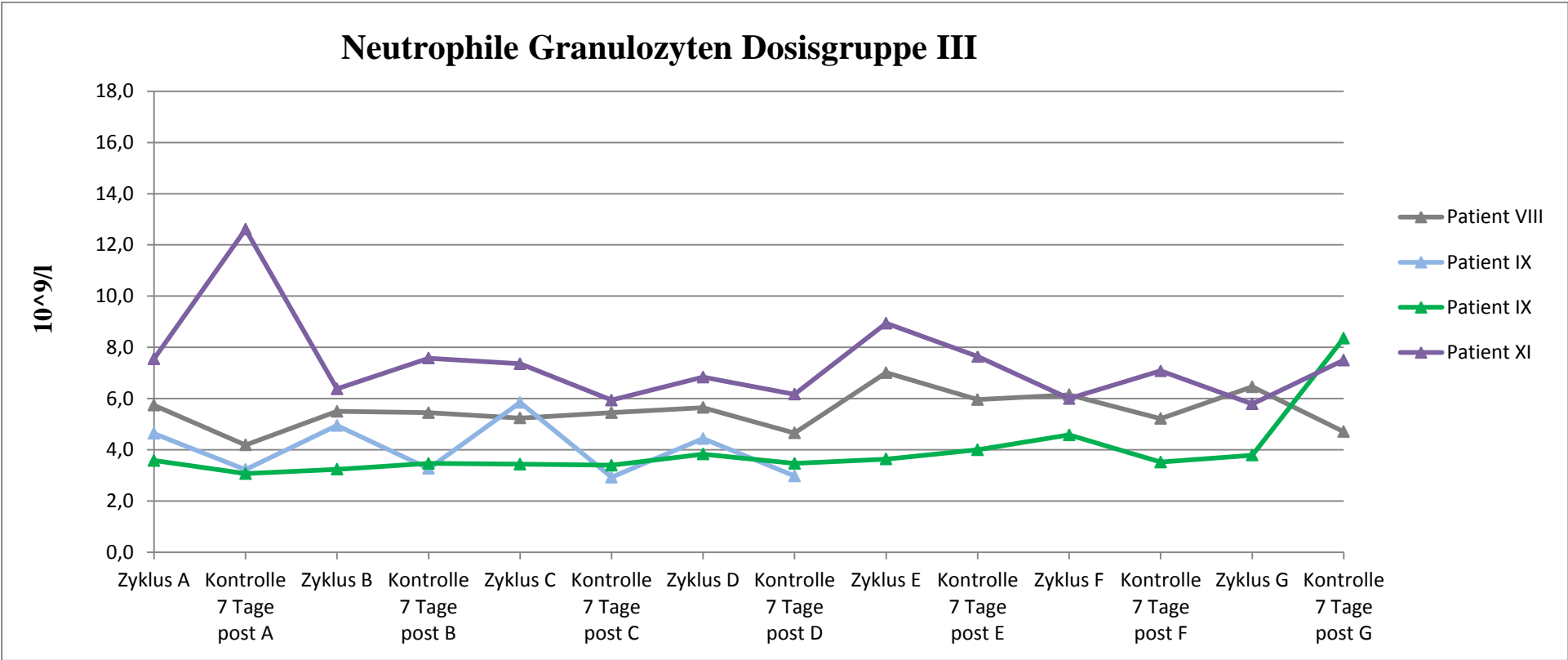




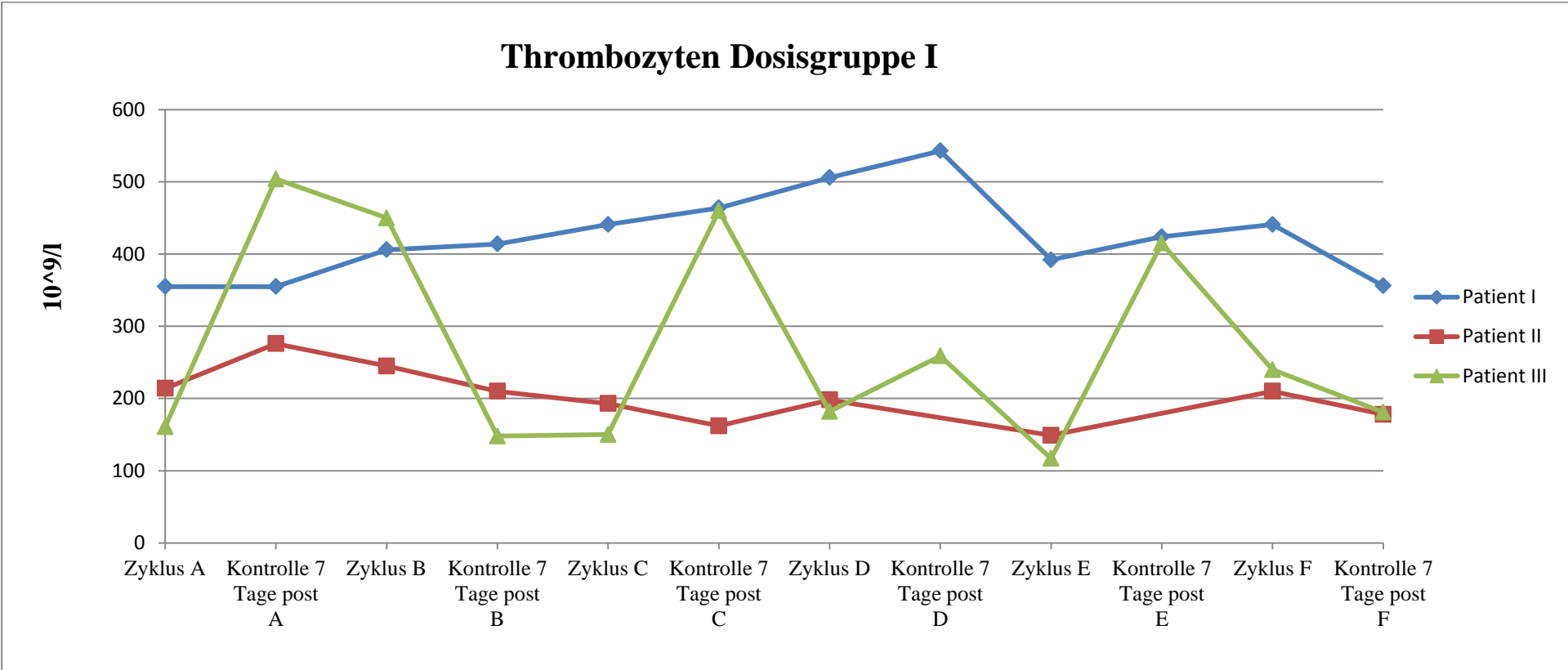
6.2.2. Neutrophile Granulozyten

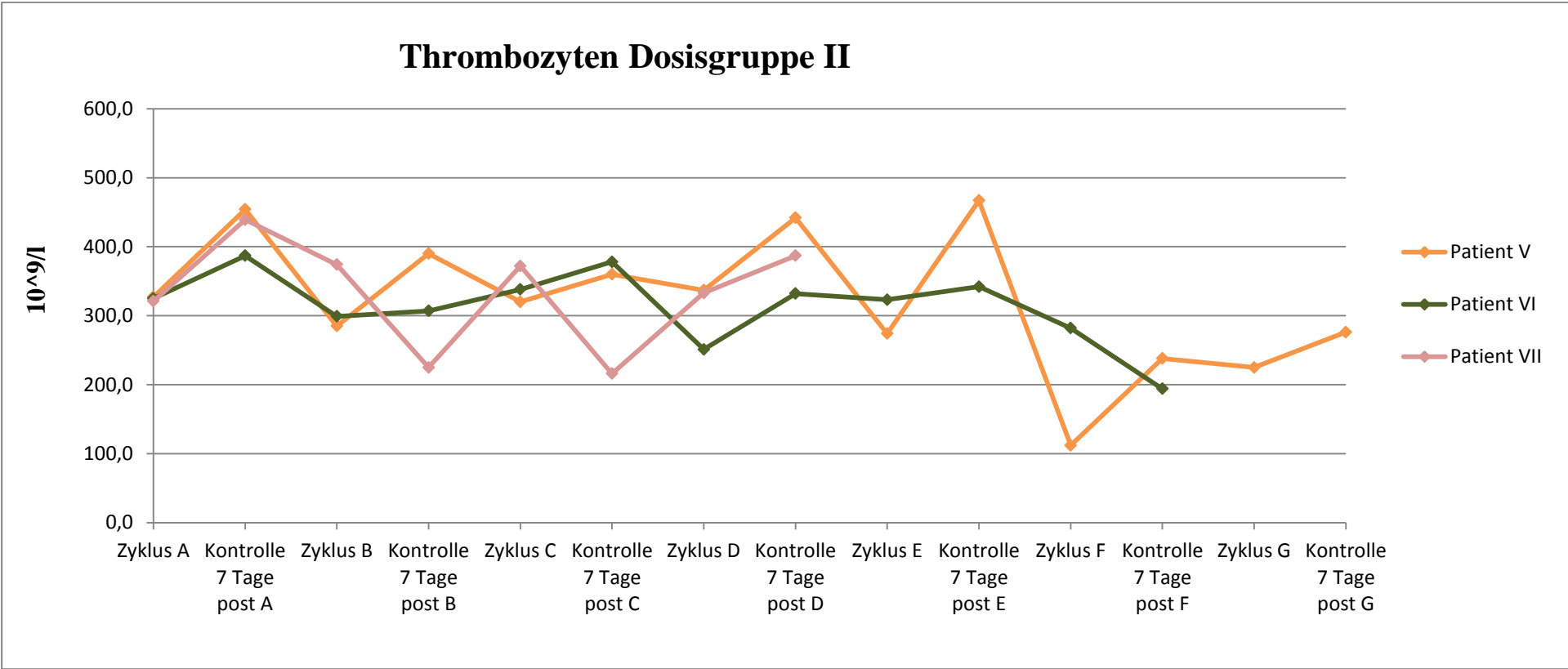


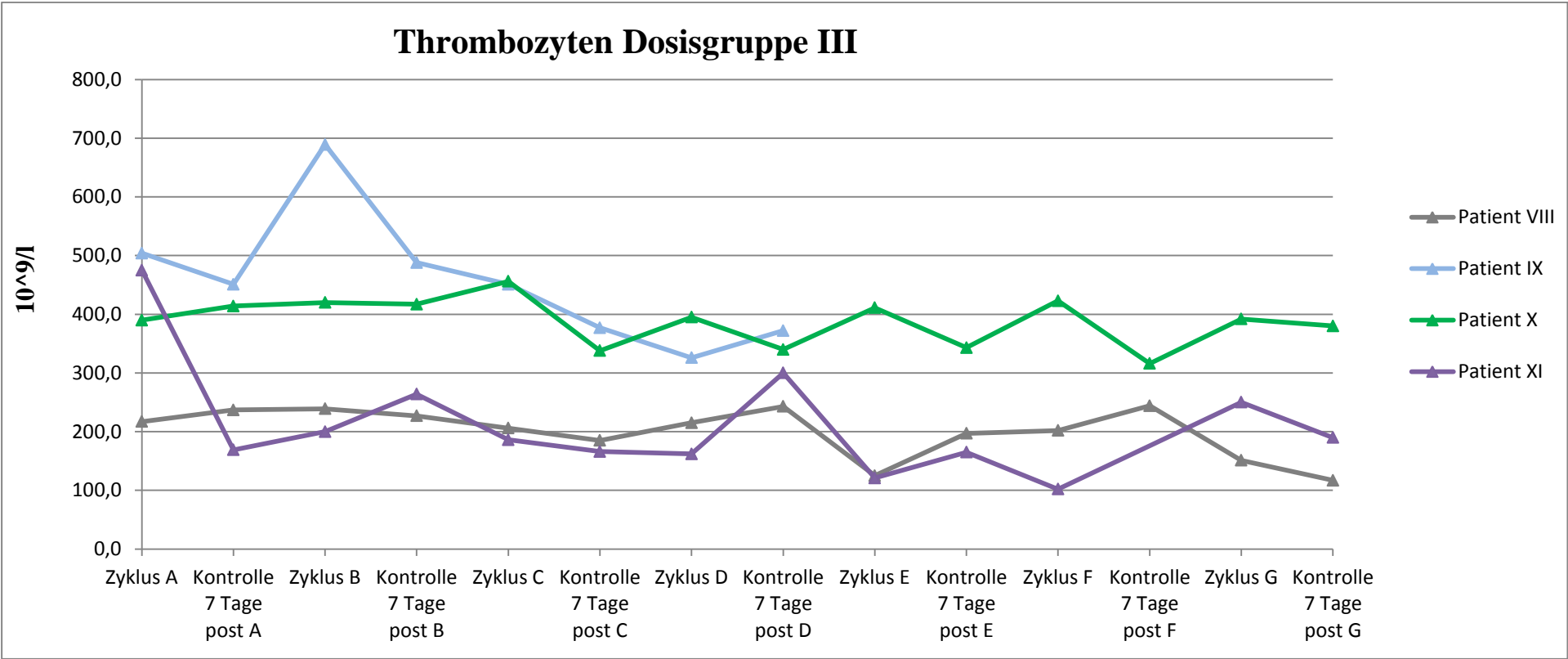




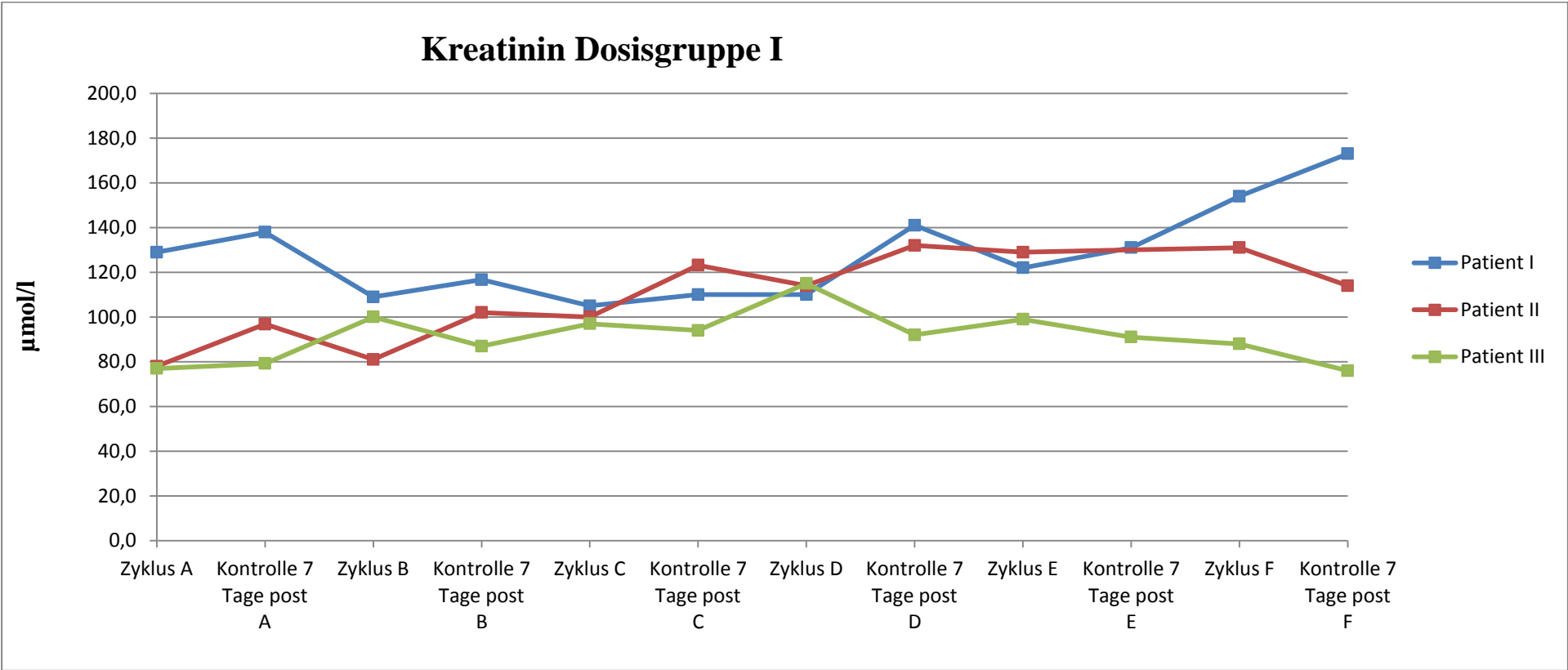
6.3. Thrombozyten

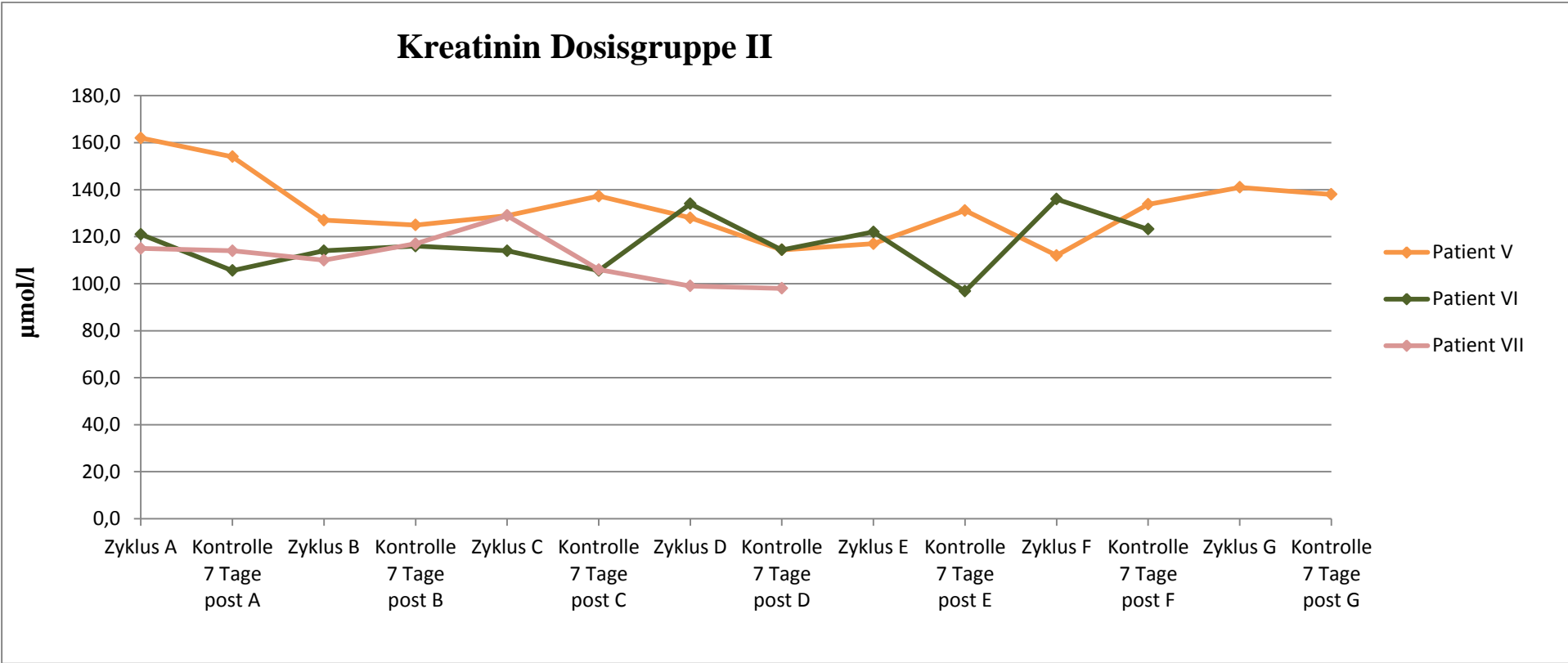


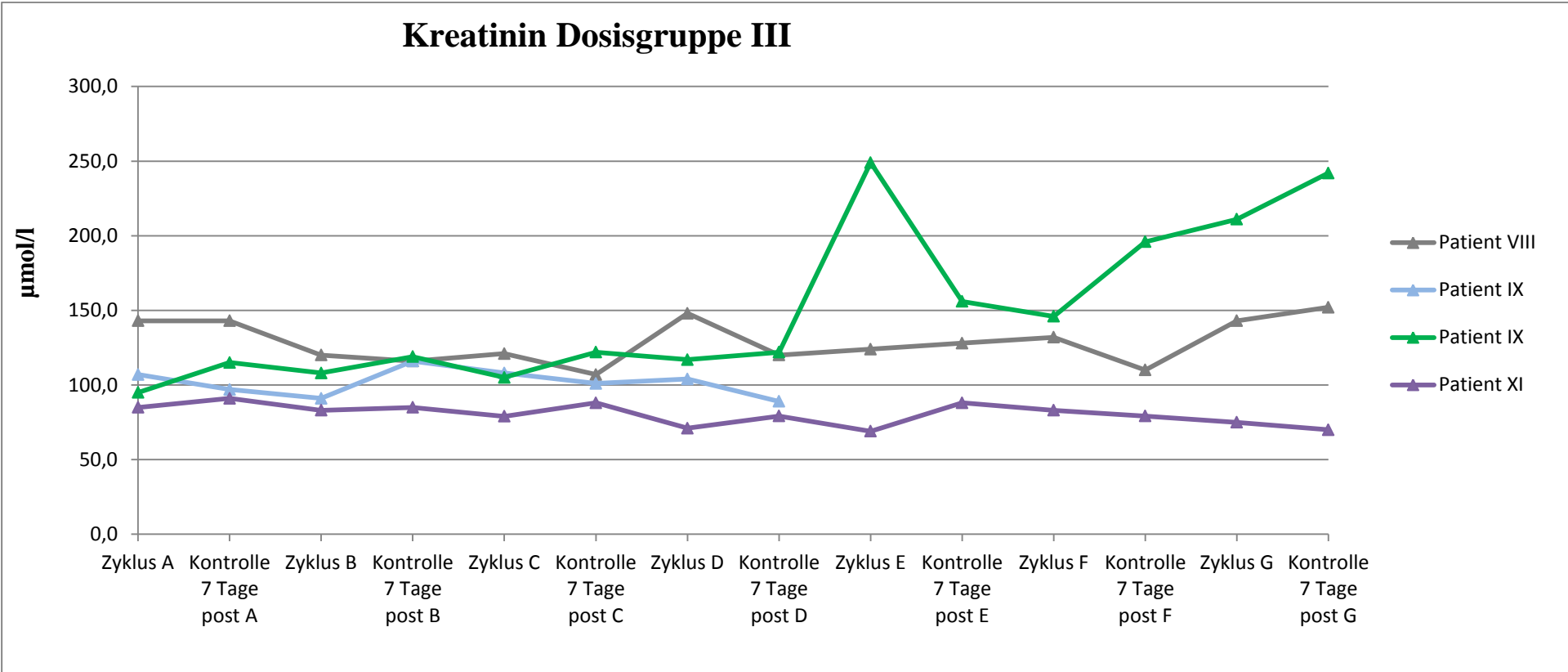




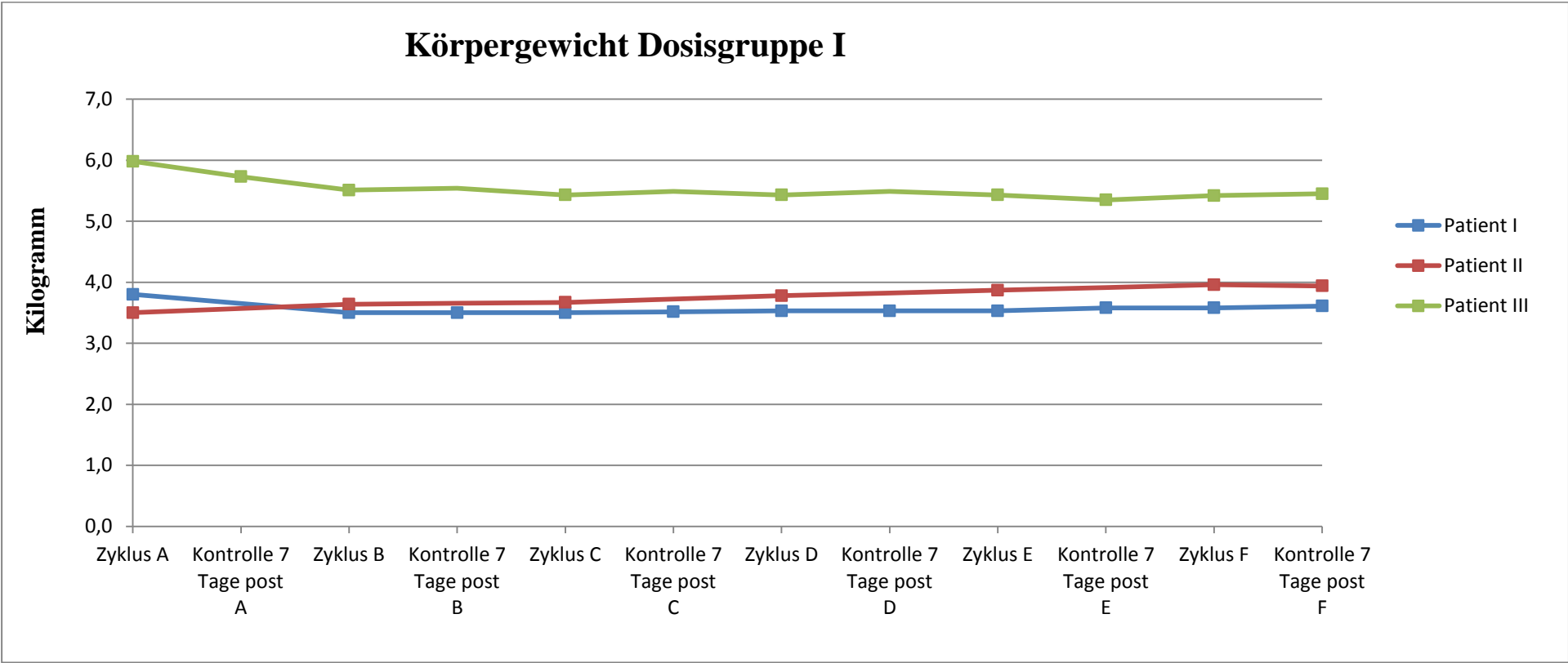
6.4. Kreatinin

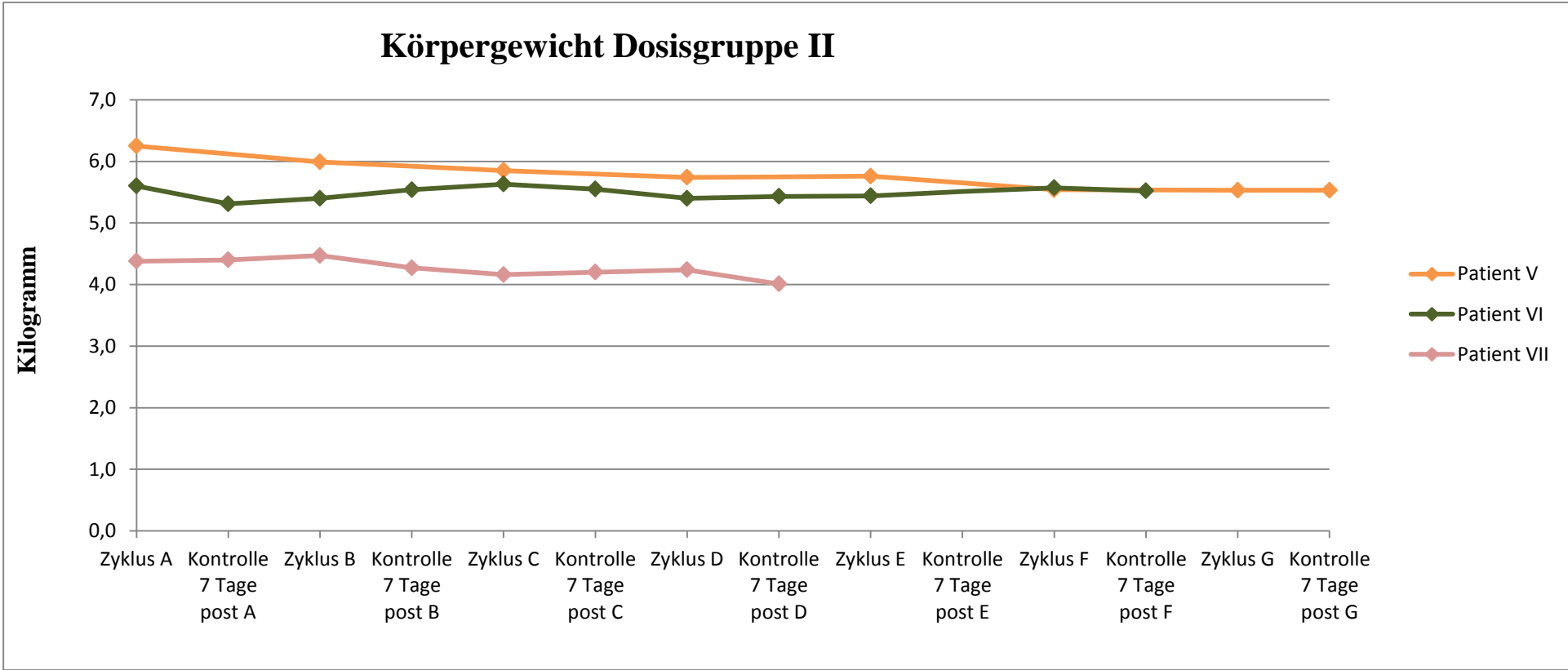


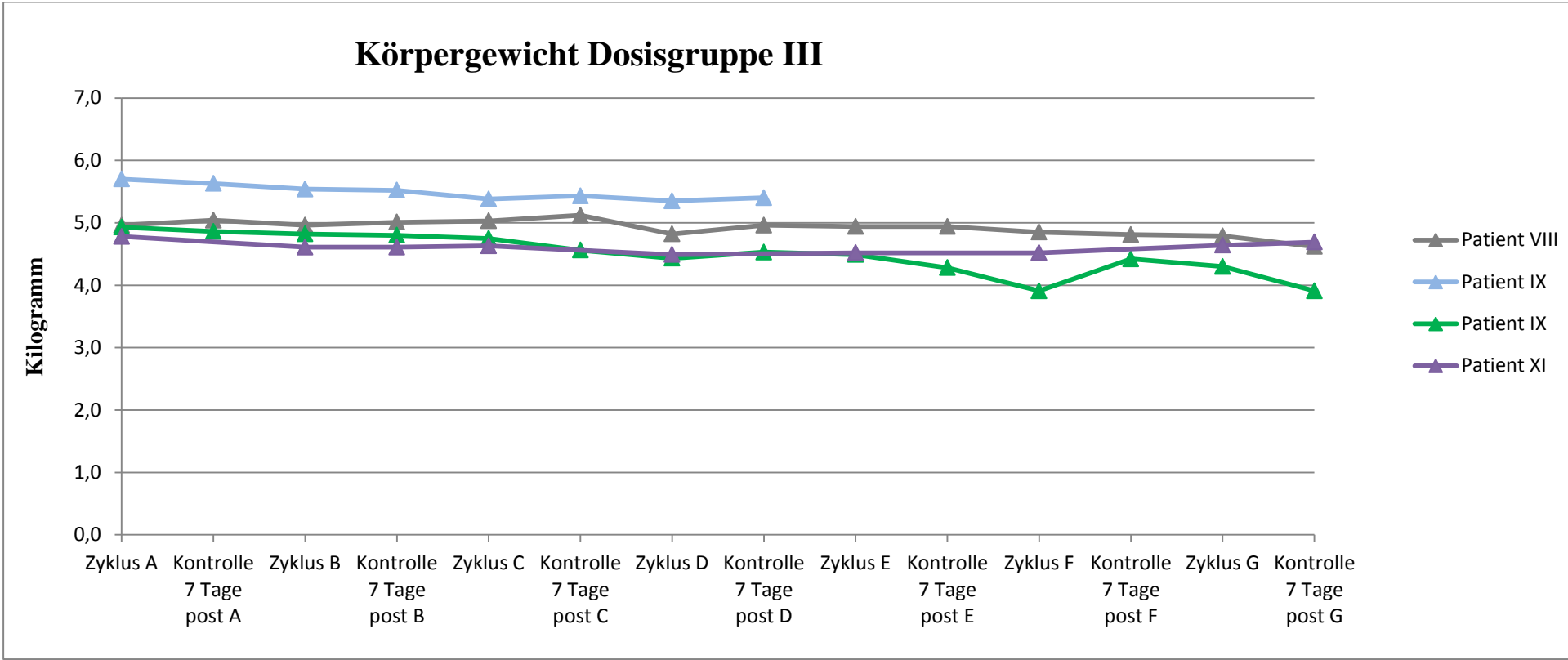




6.5. Körpergewicht







X. DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Johannes Hirschberger bedanken, dass ich dieses sehr interessante Dissertationsthema betreuen dürfte. Er war während der gesamten Zeit eine gute Unterstützung, sei es bei wissenschaftlichen Fragen oder praktischen Angelegenheiten.

Ebenfalls möchte ich mich bei PD Dr. Lars Lindner für seine Unterstützung während dieser Arbeit bedanken, sei es bei der Planung des individuellen Patienten set ups oder Fragen jeglicher Art. Dr. Martin Hossann hat für Liposomen-Nachschub gesorgt und die HPLC-Auswertungen betreut, stand aber auch immer mit Rat und Tat zuverlässig an meiner Seite und hat mich unterstützt und inspiriert. Dr. Michael Peller hat die Hyperthermiedaten ausgewertet, vielen Dank dafür. Bei der Firma Dr. Sennewald Medizintechnik GmbH und Günter Futschik bedanke ich mich für die Bereitstellung des Hyperthermie-Geräts und für die technische Betreuung des Geräts.

Bei Anke Müller und Valerie Stoz bedanke ich mich für die vielen und langen Narkosen. Dr. René Dörfelt danke ich besonders für seine Unterstützung während der Therapiesitzungen bei Fragen und Problemen jeglicher Art.

Dr. Katja Zimmermann gehört ein besonders großer Dank für ihre Hilfe, Engagement und Unterstützung während der gesamten Studienzeit.

Nina Kreutzmann und Stefanie Seiler haben die PET-MRT der Studienkatzen betreut, vielen Dank dafür. Bei Prof. Andrea Meyer-Lindenberg bedanke ich mich für die chirurgische Versorgung der Studienpatienten und bei Dr. Melanie Wergin für die anschließenden strahlentherapeutischen Behandlungen.

Ich möchte mich auch bei den praktischen Tierärzten für die Überweisungen bedanken und alle Katzenbesitzern die an der Studie teilgenommen haben für ihr Engagement und Geduld.

Meine lieben Kollegen der Onkologie möchte ich ganz herzlich für zwei unvergessliche Jahren danken. Es war eine tolle Zeit mit euch! Shunya Ohmura danke ich für seine Hilfe während der ersten Zeit der Studie. Ein besonderer Dank

geht an Katrin Thomann für ihre unermüdliche Hilfe während der Studie, sei es bei Probenentnahmen oder Kontrolluntersuchungen zu jeder Zeit.

Meiner Familie danke ich für die ferne Unterstützung und dass ihr an mich geglaubt habt. Es bedeutet mir sehr viel. Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Freund bedanken, ohne seine Hilfe und Unterstützung wäre dieser Arbeit nicht möglich gewesen.